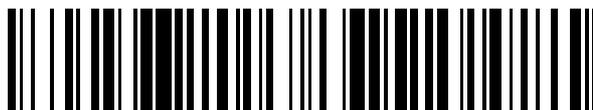


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 630**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2009 E 09789075 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2310047**

54 Título: **Vacunas de Globo H y relacionadas contra el cáncer con nuevos adyuvantes glicolipídicos**

30 Prioridad:

16.06.2009 US 485546
16.06.2008 US 61968 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2016

73 Titular/es:

ACADEMIA SINICA (100.0%)
Office of Public Affairs (Technology Licensing),
128, Academia Road, Section 2, Nankang
Taipei 11529, TW

72 Inventor/es:

WONG, CHI-HUEY;
WU, CHUNG-YI;
YU, ALICE y
YU, JOHN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 570 630 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

Vacunas de Globo H y relacionadas contra el cáncer con nuevos adyuvantes glicolipídicos

Campo técnico de la invención

5 Esta invención se refiere al campo de las vacunas contra el cáncer. En particular, la solicitud se refiere a una vacuna basada en hidratos de carbono que contiene el epítipo de células B, Globo H, que está conjugado con el portador inmunogénico DT-CRM197. Más particularmente, la invención está dirigida a vacunas de Globo H-DT contra el cáncer administradas con nuevos adyuvantes glicolípidos, tales como C34.

Antecedentes de la invención

10 Para el diseño de la terapia contra el cáncer, es deseable buscar dianas moleculares de células cancerosas o de células madre de cáncer que están ausentes en las células normales. La glicosilación aberrante se asocia a menudo con la progresión tumoral y fue descrita por primera vez por Meezan et al. en 1969 con la demostración de que los glicanos del cáncer difieren de los de las células sanas (Meezan E, et al. (1969) *Biochemistry* 8: 2518-2524). Las glicosilaciones aberrantes incluyen la pérdida o la sobre-expresión de ciertas estructuras, la persistencia de estructuras truncadas y la aparición de nuevas estructuras. Las diferencias estructurales más tarde fueron apoyadas por muchas evidencias histológicas utilizando tinción de lectina en comparación con el tejido sano y el maligno. (Turner GA (1992) *Clin Chim Acta* 208: 149-171; Gabius HJ (2000) *Naturwissenschaften* 87: 108-121).

Más recientemente, fueron identificados antígenos de hidratos de carbono asociados a tumores por anticuerpos monoclonales y espectrometría de masas (Shriver Z, et al. (2004) *Nat Rev Drug Disc* 3: 863-873; Pacino G, et al. (1991) *Br J Cancer* 63: 390-398). Hasta la fecha, se han caracterizado numerosos antígenos asociados a tumores expresados en células cancerosas en forma de glicolípidos o glicoproteínas y se han correlacionado con ciertos tipos de cáncer. (Bertozi CR, Dube DH (2005) *Nat Rev Drug Discovery* 4: 477-488). A pesar de que se sabe relativamente poco sobre el papel que los carbohidratos de superficie juegan en las células malignas, se han correlacionado los anticuerpos administrados de forma pasiva o inducidos por vacunas contra estos antígenos con un mejor pronóstico.

25 De los glicanos asociados a tumores publicados, el antígeno glicolípido Globo H (Fuc α 1 \rightarrow 2 Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc β 1 \rightarrow 3 Gal α 1 \rightarrow 4 Gal β 1 \rightarrow 4 Glc) fue aislado por primera vez e identificado en 1984 por Hakomori et al. a partir de células MCF-7 de cáncer de mama (Bremer E G, et al. (1984) *J Biol Chem* 259: 14773-14777). Otros estudios con anticuerpos monoclonales anti-Globo H mostraron que Globo H estaba presente en muchos otros tipos de cáncer, incluyendo cáncer de próstata, gástrico, pancreático, de pulmón, cánceres de ovario y de colon y sólo la mínima expresión en la superficie luminal del tejido secretor normal, lo que no es fácilmente accesible para el sistema inmunológico. (Ragupathi G, et al. (1997) *Angew Chem Int Ed* 36: 125-128). Además, se ha establecido que el suero de los pacientes con cáncer de mama contienen un alto nivel del anticuerpo anti-Globo H (Gilewski T et al. (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3270-3275; Huang C-Y, et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15-20; Wang C-C, et al. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (33): 11661-11666) y los pacientes con tumores Globo H-positivos mostraron una supervivencia más corta en comparación con los pacientes con tumores Globo H-negativos (Chang, Y-J, et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (25): 10.299-10.304). Estos resultados hacen de Globo H, un epítipo hexasacárido, un marcador tumoral atractivo y un objetivo viable para el desarrollo de vacunas del cáncer.

40 El Globo H es un antígeno cancerígeno expresado excesivamente en diversos cánceres epiteliales. Se ha sugerido que este antígeno puede servir como objetivo en la inmunoterapia del cáncer. Si bien se han desarrollado vacunas para provocar respuestas de anticuerpos contra Globo H, sus eficacias contra el cáncer no son satisfactorias debido a la baja antigenicidad de Globo H. Hay una necesidad de una nueva vacuna capaz de provocar altos niveles de respuestas inmunes dirigidas a Globo H.

45 Las células madre se definen como un grupo de células con capacidad para la auto-renovación y la diferenciación en diferentes tipos de células y tejidos (Reya T et al, (2001), *Nature* 414: 105-111). Como ambos tejidos en tumores malignos y normales contienen poblaciones heterogéneas de células, las células madre del cáncer podrían desempeñar un papel clave en el crecimiento tumoral y en el mantenimiento de la heterogeneidad del tumor. Las células madre del cáncer han sido identificadas a partir de una variedad de tumores sólidos, tales como los cánceres de cerebro, mama, colon y próstata. Al-Hajj y col. mostraron que las células madre del cáncer de mama (CMCM) en primer lugar residían en la subpoblación CD24⁻ CD44⁺ del cáncer de mama, en función de su capacidad de generar tumores con diversidad fenotípica en los xenotrasplantes en ratones NOD/SCID (Al-Hajj M, et al, (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3983-3988). La mayoría de las células del cáncer de diseminación temprana en la médula ósea de pacientes con cáncer de mama muestra el fenotipo de CD24⁻ CD44⁺ (Balic M et al, (2006) *Clin Cancer Res* 12: 5615-5621), lo que sugiere que las CMCM eran capaces de metástasis. En base a su capacidad para el crecimiento, la diferenciación y la metástasis y su resistencia a la radiación, las CMCM son un importante objetivo para la terapia del cáncer de mama (Tang C. et al, (2007) *FASEB J.* 21: 1-9).

55 En el cáncer de mama, se observó la expresión de Globo H en > 60% de carcinoma ductal, lobular y tubular, pero no en los tumores de mama no epiteliales (Mariani-Constantini R et al., (1984) *Am. J. Pathol.* 115: 47-56). Globo H no se expresa en el tejido normal excepto para una expresión débil en las células epiteliales apicales en las fronteras

del lumen, un sitio que parece ser inaccesible para el sistema inmunitario (Id.; Zhang S. et al., (1997) Int. J. Cancer 73: 42-49).

El Globo H también se expresa en células madre del cáncer de mama (CMCM). La citometría de flujo reveló que Globo H se expresaba en 25/41 de muestras de cáncer de mama (61,0%). Las no CMCM de 25/25 y las CMCM de 8/40 (20%) expresaban Globo H. El antígeno embrionario específico de la etapa 3 (SSEA-3), el precursor de pentasacáridos de Globo H, se expresa en tumores 31/40 (77,5%). Las no CMCM de 29/31 y 25/40 de las CMCM (62,5%) expresaron SSEA-3. (Chang W-W et al, (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105 (33): 11667-11672).

Danishefsky y Livingston publicaron anteriormente la preparación de la vacuna de Globo H-KLH (Gilewski T et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98: 3270 a 3275; Ragupathi G, et al. (1997) Angew Chem Int Ed 36: 125-128; Kudryashov V, et al. (1998) Glycoconj J. 15: 243-249; Slovin SF et al (1997) Proc Natl Acad Sci USA 96: 5710-5715) y la vacuna heptavalente (que contiene GM2, Globo H, Lewis Y, Tn, STn, TF, y Tn-MUC1 conjugado individualmente a KLH; Sabbatini PJ et al (2007) Clin Cancer Res 13: 4170 a 4177) contra una variedad de cánceres. Sin embargo, los pacientes inmunizados con la vacuna heptavalente indujeron respuestas de anticuerpos contra sólo cinco de los siete antígenos excepto los anticuerpos GM2 y Lewis Y. En lugar del antígeno de expresión ubicua tal como GM2, Globo H se expresó excepcionalmente en las células tumorales con sólo el nivel mínimo del tejido secretor normal, lo que hace que sea un objetivo deseable para el desarrollo de vacunas. En sus estudios, la ozonólisis de Globo H aglicona fue seguida por aminación reductora con la proteína transportadora de KLH para generar alrededor de 150 unidades de carbohidratos por proteínas (Ragupathi G, et al. (1997) Angew Chem Int Ed 36: 125-128). El refinamiento adicional aumenta la relación de conjugación de hidratos de carbono a aproximadamente 720:1 mediante el uso del enlazante de MMCCH (Wang S-K, et al. (2008). Proc Natl Acad Sci USA 105: 3.690-3.695). Sin embargo, fue difícil caracterizar con precisión el glicoconjugado. Además, la vacuna sintética en combinación con el adyuvante inmunológico QS-21 fue mostrado que inducía principalmente IgM y, en menor medida, los anticuerpos de IgG tanto en pacientes con cáncer de próstata como de mama metastásico. En la fase I de ensayos clínicos, la vacuna también mostró una toxicidad mínima con reacciones cutáneas locales transitorias en la zona de vacunación. (Gilewski T et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98: 3270 a 3.275; Ragupathi G, et al. (1997) Angew Chem Int Ed 36: 125-128; Slovin S F et al (1997) Proc Natl Acad Sci USA 96: 5710-5715). Los síntomas gripales leves que se han observado en algunos de los pacientes estaban probablemente asociados con el efecto secundario de QS-21. Se ha publicado una vacuna pentavalente que contiene cinco antígenos asociados a carbohidratos de cáncer de próstata y de mama Globo-H, GM2, STn, TF y Tn conjugados a la proteína portadora modificada con maleimida de KLH que producía sueros anti-Globo H con títulos más altos de IgG que IgM en ensayos de ELISA (Zhu J. et al. (2009) J. Am. Chem. Soc. 131 (26): 9298-9303).

Por lo tanto, es deseable identificar un portador alternativo y adyuvante para aumentar la respuesta de anticuerpos frente a Globo H, especialmente con altos títulos de IgG y para mejorar la eficacia de la vacuna con efectos secundarios mínimos.

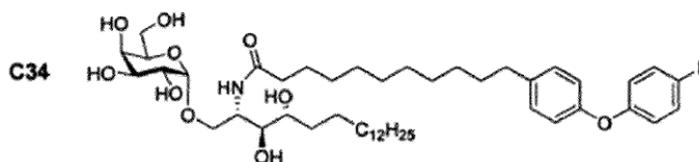
Sumario de la invención

Esta invención se refiere a una vacuna a base de hidratos de carbono que contiene Globo H (epítipo de células B) conjugado químicamente con el portador inmunogénico material 197 que reacciona de forma cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM197) (epítipo Th) a través de un enlazante de p-nitrofenilo. La vacuna sintética en combinación con un adyuvante glicolípido induce anticuerpos IgG, IgG1 e IgM y proporciona una inmunogenicidad excepcional en modelos de cáncer de mama, que muestra una tumorigénesis tardía en estudios de xenoinjerto. El análisis conjunto de glicanos de los anticuerpos inducidos por Globo H-DT y el glicolípido C34 mostró que los anticuerpos no sólo reconocen Globo H sino que también SSEA-3 (GB5) y SSEA-4 (sialil GB5) glicanos, todos específicos para células cancerosas y las células madre del cáncer.

La invención se refiere a una composición inmunógena que comprende: (a) un glicano que consiste esencialmente en Globo H o un fragmento inmunogénico del mismo, en el que el glicano se conjuga con una proteína portadora a través de un enlazante; y (b) un adyuvante que comprende un glicolípido capaz de unirse a una molécula CD1d en una célula dendrítica, en el que la composición inmunogénica induce una respuesta inmune que induce un nivel relativo más alto de anticuerpos del isotipo de IgG en comparación con los anticuerpos del isotipo de IgM.

En algunos aspectos, la proteína portadora es el material 197 que reacciona de forma cruzada con la toxina diftérica (DT-CRM 197). En algunos aspectos, el enlazante es un enlazante de p-nitrofenilo.

El adyuvante es un análogo sintético de la α -galactosil-ceramida (α -GalCer). En algunas realizaciones, el adyuvante es C34, en el que C34 comprende la estructura:



En algunos aspectos, la respuesta inmune está orientada preferiblemente hacia la producción de anticuerpos del isotipo de IgG. En algunos aspectos, la composición inmunogénica comprende al menos un adyuvante capaz de inducir una respuesta inmune humoral y celular.

5 En algunos aspectos, los anticuerpos generados por la respuesta inmune neutralizan a los antígenos expresados en las células cancerosas o en las células madre del cáncer. En algunas realizaciones, los anticuerpos generados por la respuesta inmune neutralizan al menos a uno de los antígenos Gb4, el antígeno-3 específico de la etapa embrionaria (SSEA-3) y el antígeno-4 específico de la etapa embrionaria (SSEA-4). En algunas realizaciones, los anticuerpos que neutralizan al menos uno de los antígenos Gb4, el antígeno-3 específico de la etapa embrionaria (SSEA-3) y el antígeno-4 específico de la etapa embrionaria (SSEA-4) comprenden un nivel relativo más alto de anticuerpos del isotipo IgG en comparación con los anticuerpos del isotipo IgM.

10 La invención se refiere a una vacuna contra el cáncer que comprende la composición inmunógena que es capaz de inducir respuestas inmunes contra el cáncer en un sujeto. En algunos aspectos, la vacuna contra el cáncer es adecuada para el tratamiento de un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer bucal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de la nasofaringe, cáncer dérmico, cáncer renal, tumor cerebral, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer intestinal y cáncer de vejiga.

En algunos aspectos, el tejido cancerígeno expresa un antígeno Globo H en la superficie de la célula. En algunos aspectos, el antígeno Globo H se expresa en una célula epitelial de un tumor de mama.

20 En algunas realizaciones, la vacuna contra el cáncer genera anticuerpos que neutralizan al menos uno de los antígenos Globo H, Gb4, antígeno-3 específico de la etapa embrionaria (SSEA-3) y antígeno-4 específico de la etapa embrionaria (SSEA-4). En algunos aspectos, los antígenos se expresan en una célula madre de cáncer de mama.

25 La invención se refiere a un método de tratamiento que comprende la inhibición del crecimiento tumoral, comprendiendo el método: (a) administrar a un sujeto en necesidad del mismo una composición inmunogénica que comprende un glicano que consiste esencialmente en Globo H o un fragmento inmunogénico del mismo, en el que el glicano se conjuga con una proteína portadora a través de un enlazante, y un adyuvante que comprende un glicolípido capaz de unirse a una molécula CD1d en una célula dendrítica; y (b) inducir una respuesta inmune que induce una mayor cantidad relativa de anticuerpos del isotipo IgG en comparación con los anticuerpos del isotipo IgM.

30 En algunas realizaciones del método, el enlazante es p-nitrofenol, la proteína portadora es el material 197 que reacciona de forma cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM197) y el adyuvante es un análogo sintético de la α -galactosil-ceramida (α -GalCer). En una realización, el adyuvante es C34.

35 En algunas realizaciones del método, la composición inmunógena comprende además una vacuna contra el cáncer, y además en la que uno o más tratamientos con una cantidad eficaz de la vacuna contra el cáncer inhiben el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, la administración de la vacuna contra el cáncer reduce el tamaño de un tumor.

40 En algunas realizaciones del método, en el que la respuesta inmune se orienta preferiblemente hacia la producción de anticuerpos del isotipo IgG que neutralizan al menos uno de los antígenos Globo H, Gb4, antígeno-3 específico de la etapa embrionaria (SSEA-3) y antígeno-4 específico de la etapa embrionaria (SSEA-4). En algunos aspectos, al menos uno de los antígenos Globo H, antígeno-3 específico de la etapa embrionaria (SSEA-3) y antígeno-4 específico de la etapa embrionaria (SSEA-4) se expresa en una célula madre de cáncer de mama. En algunos aspectos, el antígeno Globo H se expresa en una célula epitelial de un tumor de mama.

45 La invención se refiere a una vacuna contra el cáncer que comprende: (a) una composición inmunogénica que comprende: un glicano que consiste esencialmente en Globo H o un fragmento inmunogénico del mismo, en el que el glicano se conjuga con una proteína portadora a través de un enlazante, y un adyuvante que comprende un glicolípido capaz de unirse a una molécula CD1d en una célula dendrítica, en el que la composición inmunogénica induce una respuesta inmune que induce un nivel relativo más alto de anticuerpos del isotipo IgG en comparación con los anticuerpos del isotipo IgM; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 En algunos aspectos, la vacuna contra el cáncer comprende una composición inmunogénica que es el enlazante p-nitrofenol, la proteína portadora es el material 197 que reacciona de forma cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM197) y el adyuvante es un análogo sintético de la α -galactosil-ceramida (α -GalCer). En una realización, el adyuvante es C34.

55 En algunos aspectos, la vacuna contra el cáncer se usa para tratar un cáncer, en el que uno o más tratamientos con una cantidad eficaz de la vacuna contra el cáncer inhiben el crecimiento tumoral. En algunas realizaciones, la administración de la vacuna contra el cáncer reduce el tamaño de un tumor. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer bucal,

cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de la nasofaringe, cáncer dérmico, cáncer renal, tumor cerebral, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer intestinal y cáncer de vejiga.

5 La invención se refiere a una composición inmunogénica que comprende: (a) un glicano que consiste esencialmente en un glicano relacionado con H Globo o un fragmento inmunogénico del mismo, en el que el glicano se conjuga con una proteína portadora a través de un enlazante; y (b) un adyuvante que comprende un glicolípido capaz de unirse a una molécula CD1d en una célula dendrítica, en el que el glicano relacionado con Globo H se selecciona del grupo que consiste en SSEA-3 y SSEA-4, y en el que la composición inmunogénica induce una respuesta inmune que induce un nivel relativo más alto de los anticuerpos del isotipo IgG en comparación con los anticuerpos del isotipo IgM.

10 En algunos aspectos de la composición inmunogénica la proteína portadora es el material 197 que reacciona de forma cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM197), el adyuvante es un análogo sintético de la α -galactosilceramida (α -GalCer) y el enlazante es un enlazante de p-nitrofenilo. En una realización, el adyuvante es C34.

15 La invención se refiere a un agente terapéutico contra las células madre de cáncer de mama, comprendiendo el agente terapéutico: Globo H conjugado a través de un enlazante de p-nitrofenilo con el material 197 que reacciona de forma cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM197); y un adyuvante que comprende un glicolípido capaz de unirse a una molécula CD1d en una célula dendrítica. En algunas realizaciones de la terapéutica, el adyuvante es C34.

20 La invención se refiere a un agente terapéutico contra las células madre del cáncer de mama, comprendiendo el agente terapéutico: SSEA-3 conjugado a través de un enlazante de p-nitrofenilo con una proteína portadora del material 197 (DT-CRM197) que reacciona de forma cruzada con la toxina de la difteria; y un adyuvante que comprende un glicolípido C34 capaz de unirse a una molécula CD1d en una célula dendrítica.

25 La invención se refiere a un agente terapéutico contra las células madre del cáncer de mama, comprendiendo el agente terapéutico: SSEA-4 conjugado a través de un enlazante de p-nitrofenilo con una proteína portadora del material 197 (DT-CRM197) que reacciona de forma cruzada con la toxina de la difteria. En algunas realizaciones, el agente terapéutico comprende además un adyuvante que comprende un glicolípido capaz de unirse a una molécula CD1d en una célula dendrítica.

30 La administración de los agentes terapéuticos de la invención a un sujeto induce la producción de anticuerpos que reconocen un antígeno expresado en una célula madre del cáncer de mama (CMCM), en el que el antígeno se selecciona del grupo que consiste en Globo H, SSEA-3 y SSEA-4. La invención se refiere a un método para el tratamiento del cáncer de mama que comprende la administración de un agente terapéutico de la invención.

Breve descripción de los dibujos

35 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente descripción; cuyas invenciones se pueden entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento. El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta publicación de solicitud de patente o patente con el dibujo o los dibujos en color serán proporcionadas por la Oficina bajo petición y pago de la tasa necesaria.

La figura 1 muestra las estructuras de Globo H y los derivados truncados.

40 Las figuras 2A-2C muestran la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales VK9 y Mbr1 (a Globo H) y anti-SSEA-3, respectivamente.

45 Las figuras 3A-3B muestran la respuesta serológica de ratones vacunados con diversos conjugados de Globo H y α -GalCer. Grupos de tres ratones C57BL/6 fueron vacunados por vía subcutánea con 1 μ g de glicoconjugados sintéticos con o sin 2 μ g de glicolípidos. Los sueros de los ratones se diluyeron 1:60 y 1:240, respectivamente, para el análisis de los anticuerpos de IgM (figura 3A) e IgG (figura 3B). Los anticuerpos secundarios de IgG o IgM Cy3-anti-ratón se utilizaron para la detección de la fluorescencia a 532 nm, PMT 500. Los datos representan la intensidad de fluorescencia como promedio de tres ratones \pm SEM.

La figura 4 muestra las estructuras de α -GalCer y análogos.

50 La figura 5 muestra los niveles de IgM de ratones vacunados con conjugados de Globo H y derivados de α -GalCer. Los sueros de ratón se recogieron y analizaron después de las 2^a y 3^a vacunas, tal como se muestra. El IgM anti-ratón de Cy3 secundario se utilizó para la detección a 532 nm, PMT 400. Los resultados representan la intensidad media de fluorescencia de tres ratones \pm SEM.

La figura 6 muestra la especificidad fina de un anticuerpo policlonal de ratón (anti-Globo H, anti-GB5, anti-SSEA-4 y anti-Gb4) después de la vacunación. Se obtuvieron sueros de los ratones dos semanas después de la 3^a vacunación con 1,6 μ g de GH-DT con o sin 2 μ g de adyuvante. (Hembras, Balb/c, por vía intramuscular). Los títulos de IgG se

analizaron por micromatriz de glicano y se definieron como la mayor dilución que produce el MFI mayor de 1000 (10 veces sobre la línea de fondo), PMT 400. Cada punto se presenta como el título individual del ratón.

La figura 7 muestra los títulos de los anticuerpos de IgM vs. IgG de Globo H-DT con diferentes adyuvantes.

5 La figura 8 muestra la evaluación de las actividades de los adyuvantes con vacunas GH-KLH. Fueron vacunados ratones Balb/c hembra por vía i.m. con 1,6 µg de GH-KLH y 2 µg de los adyuvantes indicados y se les extrajo sangre cada dos semanas después de la vacunación. Los sueros se diluyeron y se introdujeron en el análisis de micromatrices.

10 La figura 9 muestra el perfil de isotipo de anticuerpos después de las inmunizaciones. Los ratones fueron vacunados tal como se describe. Se introdujeron sueros (diluciones 1:60) en micromatrices para el análisis de las subclases de anticuerpos (532 nm, 300 PMT). Los datos se presentan como la media de la fluorescencia de tres ratones ± SEM.

La figura 10 muestra los títulos de anticuerpos de IgM frente a IgG inducidos por SSEA-3-DT o SSEA-4-DT con diferentes tipos de adyuvantes glicolípidos.

La figura 11 muestra las estructuras de 24 glicanos en la superficie celular.

15 Las figuras 12A-12C muestran los estudios de reactividad cruzada de IgG inducida por diferentes vacunas; Figura 12 A: IgG anti-Globo H inducida por Globo H-DT con adyuvante C1; Figura 12 B: IgG anti-GB5 inducida por GB5-DT con adyuvante C1; Figura 12 C: IgG anti-SSEA-4 inducida por SSEA-4-DT con adyuvante C1.

La figura 13 muestra un modelo de xenoinjerto de ratón. Se prepararon 2×10^5 células 4T1 tumorales mamarias metastásicas de ratón en PBS estéril y se inyectaron por vía subcutánea a ratones Balb/c vacunados. El tamaño del tumor del ratón se midió mediante un calibrador Vernier y se define como $(\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{anchura}) / 2 \text{ (mm}^3\text{)}$.

20 La figura 14 muestra un esquema para la síntesis del éster medio de Globo H y glicoconjugados.

25 La figura 15 muestra el análisis por citometría de flujo de la expresión de SSEA-4 en células madre de cáncer de mama primario. La expresión de SSEA-4 en la superficie de las CMCM y las no CMCM se evaluó con cuatro colores de la tinción de inmunofluorescencia y posterior análisis de citometría de flujo. Las CMCM se definieron como células CD45⁺/CD24⁻/CD44⁺, y las no CMCM se definieron como otras poblaciones de células CD45⁺, como se muestra en el grupo izquierdo. La expresión de antígenos de interés en las CMCM y las no CMCM se muestra en el grupo central y derecho, respectivamente. La línea de puntos representa el control de isotipos, y los números representan el porcentaje de células positivas.

30 La figura 16 muestra la expresión de SSEA-4 restringida en tejidos normales. La tinción inmunohistoquímica de las matrices de tejido normal se utilizó para examinar la expresión de SSEA-4 en mama, intestino delgado y recto. La tinción positiva para SSEA-4 estaba restringida a la superficie apical de las células epiteliales.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención se refiere al hallazgo sorprendente de que DT-CRM197 es una proteína portadora prometedor para Globo H y SSEA-4 no sólo debido a que ha sido ampliamente utilizada para la vacunación humana contra la difteria durante décadas, sino también debido a sus propiedades altamente inmunogénicas. Lo más importante es que haya sido aprobada por la FDA para diversas vacunas de glicoconjugados. El material 197 que presenta reacción cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM 197) es un mutante no tóxico (G52E) de DT que comparte las propiedades inmunológicas de la molécula nativa y su capacidad para unirse al factor de crecimiento epidérmico que se une a la heparina (HB-EGF), el receptor de membrana celular específico para DT que a menudo se sobreexpresa en el cáncer (Buzzi S. et al, Cancer Immunology, Immunotherapy (2004), 53 (11): 1041-1048).

40 Utilizando C34 como adyuvante, tanto GH-DT y SSEA-4-DT mostraron la respuesta inmune más eficaz para inducir más anticuerpos de IgG que de IgM contra los antígenos tumorales. La GH-DT en combinación con anticuerpos inducidos por C34 no sólo neutralizan Globo H sino que también SSEA-3 (GB5) y SSEA-4, todos los cuales son específicos de las células del cáncer de mama y las células madre del cáncer.

45 Además, la micromatriz de glicano dada a conocer ofrece una potente plataforma para la prueba de la especificidad del anticuerpo y es útil en la identificación de pacientes para los ensayos de la vacuna y para el seguimiento de su respuesta inmune después de la inmunización.

50 En la siguiente descripción se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman una parte de la misma, y en los que se muestra a modo de ilustración realizaciones específicas que pueden ponerse en práctica. Estas realizaciones se describen en detalle para permitir a los expertos en la técnica poner en práctica la invención y debe entenderse que pueden utilizarse otras realizaciones y que pueden ser hechos cambios estructurales, lógicos y eléctricos sin apartarse del alcance de la presente invención. La siguiente descripción de realizaciones ilustrativas, por lo tanto, no debe tomarse en un sentido limitado y el alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usa en el presente documento, el término "glicano" se refiere a un polisacárido u oligosacárido. El glicano también se utiliza en este documento para referirse a la porción de hidrato de carbono de un glicoconjugado, tal como una glicoproteína, glicolípido, glicopéptido, glicoproteoma, peptidoglicano, lipopolisacárido o un proteoglicano. Los glicanos por lo general consisten exclusivamente en enlaces O-glucosídicos entre monosacáridos. Por ejemplo, la celulosa es un glicano (o más específicamente un glucano) compuesto de D-glucosa β -1,4-ligada, y la quitina es un glicano compuesto de N-acetil-D-glucosamina β -1,4-ligada. Los glicanos pueden ser homo o heteropolímeros de restos de monosacáridos y pueden ser lineales o ramificados. Los glicanos se pueden encontrar unidos a las proteínas como en las glicoproteínas y los proteoglicanos. Se encuentran generalmente en la superficie exterior de las células. Los glicanos O- y N-ligados son muy comunes en eucariotas, aunque también se pueden encontrar, pero con menor frecuencia, en procariotas. Los glicanos ligados a N se encuentran unidos al nitrógeno (N) del grupo R de la asparagina en la sequon. La sequon es una secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, donde X es cualquier aminoácido excepto proliné.

Tal como se utiliza en este documento, el término "glicoproteína" se refiere a una proteína modificada covalentemente con glicano(s). Hay cuatro tipos de glicoproteínas: 1) glicoproteínas unidas a N, 2) glicoproteínas unidas a O (mucinas), 3) glucosaminoglicanos (GAG, los cuales son también llamados proteoglicanos), 4) ancladas a GPI. La mayoría de las glicoproteínas tienen micro-heterogeneidad estructural (diferentes múltiples estructuras de glicanos unidas en el mismo sitio de glicosilación) y macro-heterogeneidad estructural (múltiples sitios y tipos de unión de glucano).

Tal como se utiliza en este documento, el término "antígeno" se define como cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta inmune.

Tal como se utiliza en este documento, el término "inmunógeno" se refiere a un antígeno o una sustancia capaz de inducir la producción de un antígeno, tal como una vacuna de ADN.

Tal como se utiliza en este documento, el término "inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de un inmunógeno, antígeno o vacuna para estimular una respuesta inmune.

Tal como se utiliza en este documento, el término "inmunoterapia" se refiere a una serie de estrategias de tratamiento basadas en el concepto de la modulación del sistema inmunitario para conseguir un objetivo profiláctico y/o terapéutico.

Tal como se utiliza en este documento, el término "CD1d" se refiere a un miembro de la familia de CD1 (grupo de diferenciación 1) de glicoproteínas expresadas en la superficie de diversas células presentadoras de antígenos humanas. Los antígenos lipídicos presentados con CD1d activan las células T asesinas naturales. Las CD1d tienen un surco profundo de unión al antígeno en el que se unen los antígenos glicolípidos. Las moléculas CD1d expresadas en las células dendríticas pueden unirse y presentar glicolípidos, incluyendo los análogos α -GalCer tales como C34.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "sistema inmune adaptativo" se refiere a células sistémicas altamente especializadas y procesos que eliminan exposiciones a patógenos. Las células del sistema inmune adaptativo son un tipo de leucocitos, llamados linfocitos. Las células B y las células T son los principales tipos de linfocitos.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células T" y "Ts" se refieren a un grupo de glóbulos blancos conocidos como linfocitos, que juegan un papel central en la inmunidad mediada por las células. Las células T se pueden distinguir de otros tipos de linfocitos, tales como las células B y NK por la presencia de un receptor especial en su superficie celular llamado el receptor de las células T (RCT). Varios subconjuntos diferentes de células T se han descrito, cada uno con una función distinta. Las células cooperadoras T (TH) son los "intermediarios" del sistema inmune adaptativo. Una vez activado, se dividen rápidamente y secretan pequeñas proteínas llamadas citoquinas que regulan o "ayudan" a la respuesta inmune. En función de las señales recibidas de las citoquinas, estas células se diferencian en T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} , o uno de los otros subconjuntos, que secretan diferentes citoquinas.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "célula presentadora de antígeno" (CPA) se refiere a una célula que muestra un antígeno ajeno complejo con el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en su superficie. Las células T pueden reconocer este complejo utilizando su RCT. Las CPA se dividen en dos categorías: profesionales o no profesionales. Las células dendríticas (CD) entran en la categoría profesional y son capaces de presentar antígenos a las células T, en el contexto de CD1. En una implementación de ejemplo, las CD utilizadas en los métodos de esta descripción pueden ser de cualquiera de varios subconjuntos de CD, que se diferencian de, en una implementación, linfoide o, en otra implementación, progenitores de médula ósea mieloides.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "célula naïve" se refiere a una célula del sistema inmunológico no diferenciada, por ejemplo una célula T CD4, que no ha sido todavía especializada para reconocer un patógeno específico.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células asesinas naturales" y "NK" se refiere a una clase de células linfoides que son activadas por interferones para contribuir a la defensa innata del huésped frente a virus y otros patógenos intracelulares.

5 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "células T asesinas naturales" (NKT) se refiere a un subconjunto de células T que comparten características/receptores con ambos Ts y NK convencionales. Muchas de estas células reconocen la molécula CD1d no polimórfica, una molécula presentadora de antígeno que se une a lípidos y glicolípidos propios y ajenos. El RCT de los NKT son capaces de reconocer antígenos glicolípidos presentados (acompañados) por una molécula CD1d. Una respuesta principal de los NKT es la rápida secreción de citoquinas, incluyendo IL-4, IFN- γ e IL-10 después de la estimulación y, por lo tanto la influencia en diversas respuestas inmunes y los procesos patógenos. Las NKT pueden ser una población homogénea o una población heterogénea. En una implementación a modo de ejemplo, la población puede ser "NKT no invariantes", que pueden comprender poblaciones de células T de hígado humanas y de médula ósea humana y de ratón y que son, por ejemplo, células T CD1d reactivas no invariantes que expresan diversos RCT, y que también pueden producir una gran cantidad de IL-4 e IFN- γ . El subconjunto más conocido de NKT CD1d-dependiente expresa una cadena invariante de RCT-alfa (RCT- α). Estos se conocen como invariantes de tipo I o NKT (iNKT). Estas células se conservan entre los humanos (V α 24i NKTs) y los ratones (V α 14i NKTs) y están implicadas en muchos procesos inmunológicos.

20 Tal como se utiliza en este documento, el término "citoquina" se refiere a cualquiera de las numerosas pequeñas proteínas secretadas que regulan la intensidad y la duración de la respuesta inmune por afectar al proceso de diferenciación de las células inmunes que, por lo general, implica cambios en la expresión génica por la cual una célula precursora se convierte en un tipo distinto de célula especializada. Las citoquinas se han nombrado de forma diversa como linfoquinas, interleuquinas y quimiocinas, en base a su presunta función, células de secreción, o el objetivo de la acción. Por ejemplo, algunas interleuquinas comunes incluyen, pero no se limitan a, IL-12, IL-18, IL-2, IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10, IL-13, IL-21 y TGF- β .

25 Tal como se utiliza en este documento, el término "quimiocina" se refiere a cualquiera de las diversas pequeñas citoquinas quimiotácticas liberadas en el sitio de infección que proporcionan un medio para la movilización y activación de los linfocitos. Las quimiocinas atraen a los leucocitos a los sitios de infección. Las quimiocinas han conservado restos de cisteína que les permiten ser asignadas a cuatro grupos. Los grupos, con quimiocinas representativas, son quimiocinas C-C (RANTES, MCP-1, MIP-1 α y MIP-1 β), quimiocinas C-X-C (IL-8), quimiocinas C (linfotactina), y quimiocinas CXXC (fractalquina).

30 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "respuesta de tipo T_H2" se refiere a un patrón de expresión de citoquinas tal que se producen ciertos tipos de citoquinas, interferones, quimiocinas. Las citoquinas T_H2 típicas incluyen, pero no se limitan a, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

35 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "respuesta de tipo T_H1" se refiere a un patrón de expresión de citoquinas tal que se producen ciertos tipos de citoquinas, interferones, quimiocinas. Las citoquinas T_H1 típicas incluyen, pero no se limitan a, IL-2, IFN- γ , GM-CSF y TNF- β .

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "T_H1 parcial" se refiere a una respuesta inmunogénica en la que la producción de citoquinas T_H1 y/o quimiocinas se incrementa en mayor medida que la producción de citoquinas T_H2 y/o quimiocinas.

40 Tal como se utiliza en este documento, el término "epítipo" se define como las partes de una molécula de antígeno que entran en contacto con el sitio de unión de antígeno de un anticuerpo o un receptor de células T.

45 Tal como se utiliza en este documento, el término "vacuna" se refiere a una preparación que contiene un antígeno, que consiste en organismos enteros que causan enfermedades (muertos o debilitados) o componentes de tales organismos, tales como proteínas, péptidos o polisacáridos, que se utiliza para conferir inmunidad contra la enfermedad frente a los organismos que la causan. Las preparaciones de vacuna pueden ser naturales, sintéticas o derivadas mediante tecnología de ADN recombinante.

50 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "adyuvante inmunológico" se refiere a una sustancia que se utiliza en conjunción con un inmunógeno que mejora o modifica la respuesta inmunitaria al inmunógeno. Los análogos de α -GalCer de la presente descripción se utilizan como adyuvantes inmunológicos para modificar o aumentar los efectos de una vacuna estimulando el sistema inmune de un paciente al que se administra la vacuna para responder a la vacuna con más fuerza. En una implementación ejemplar, el análogo C34 se usa como adyuvante.

55 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "adyuvante de aluminio" se refiere a una sal de aluminio con actividad adyuvante inmune. Este agente se adsorbe y precipita antígenos de proteínas en la solución; el precipitado resultante mejora la inmunogenicidad de la vacuna, al facilitar la liberación lenta de antígeno del depósito de la vacuna formado en el sitio de la inoculación.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "agente activo de inmunoterapia anti-tumor" se refiere a un anticuerpo generado por una vacuna de la presente descripción que inhibe, reduce y/o elimina los tumores.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "antígeno específico" se refiere a una propiedad de una población de células de tal manera que el suministro de un antígeno particular, o un fragmento del antígeno, resulta en una proliferación celular específica.

5 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "citometría de flujo" o "FACS" se refiere a una técnica para examinar las propiedades físicas y químicas de las partículas o células suspendidas en una corriente de fluido, a través de dispositivos de detección óptica y electrónica.

10 Los restos de aminoácidos en los péptidos de aquí en adelante se pueden abreviar como sigue: Fenilalanina es Phe o F; Leuquina es Leu o L; Isoleuquina es Ile o I; Metionina es Met o M; Valina es Val o V; Serina es Ser o S; Prolina es Pro o P; Treonina es Thr o T; Alanina es Ala o A; Tirosina es Tyr o Y; Histidina es His o H; Glutamina es Gln o Q; Asparagina es Asn o N; Lisina es Lys o K; Ácido aspártico es Asp o D; Ácido glutámico es Glu o E; Cisteína es Cys o C; Triptófano es Trp o W; Arginina es Arg o R; y Glicina es Gly o G. Para una descripción adicional de aminoácidos, por favor, refiérase a *Proteins: Structure and Molecular Properties*, de Creighton, T. E., W. H. Freeman & Co., Nueva York, 1983.

15 Las composiciones descritas en este documento pueden ser incluidas en una composición farmacéutica o nutracéutica junto con agentes adicionales activos, vehículos, portadores, excipientes o agentes auxiliares identificables por un experto en la técnica tras la lectura de la presente descripción.

20 Las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas comprenden preferiblemente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En tales composiciones farmacéuticas, las composiciones descritas en el presente documento forman el "compuesto activo", también se hace referencia como el "agente activo". En la presente memoria la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes isotónicos y de absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones. Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, (por ejemplo, inhalación) oral, transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como el ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

35 Sujeto, tal como se utiliza en este documento, se refiere a seres humanos y primates no humanos (por ejemplo, guerrilla, macaco, mono tití), animales de granja (por ejemplo, oveja, vaca, caballo, burro y cerdo), animales de compañía (por ejemplo, perro, gato), animales de laboratorio (por ejemplo, ratón, conejo, rata, cobaya, hámster), animales salvajes en cautividad (por ejemplo, zorro, ciervo) y cualesquiera otros organismos que pueden beneficiarse de los agentes de la presente descripción. No hay limitación en el tipo de animal que podría beneficiarse de los agentes descritos actualmente. Un sujeto, independientemente de si se trata de un organismo humano o no humano, puede ser denominado paciente, individuo, animal, huésped o destinatario.

45 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y ser conservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

60 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes

requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secado al vacío y liofilización, lo que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

- 5 Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas; por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal. Pueden ser incluidos agentes de unión farmacéuticamente compatibles, o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, 10 cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.
- 15 Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización de aerosol desde el contenedor o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser transmucosa o transdérmica. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear en la formulación. Tales agentes 20 penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse a través del uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases convencionales para supositorios tales como 25 manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

De acuerdo con las implementaciones, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilen-vinil-acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido 30 poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. También pueden obtenerse materiales comerciales de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Se pueden utilizar también suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos específicos de células) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe 35 en la patente de EE.UU. No. 4.522.811, que se incorpora en este documento por referencia.

Es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Una forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; 40 conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La 45 relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos. Aunque se pueden utilizar compuestos que exhiben efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado de diseñar un sistema de administración que dirija a dichos compuestos al sitio de ubicación afectado para minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivos celulares y estudios animales pueden usarse para formular un 50 intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede 55 formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante en plasma que incluya la IC₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición media máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

Tal como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo (es decir, una dosificación eficaz) puede variar de aproximadamente 0,001 a 100 g/kg de peso corporal, u otros intervalos que serían evidentes y comprendidos por los expertos sin experimentación indebida. El técnico experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requerido para tratar eficazmente un sujeto, incluyendo pero no limitado, a la severidad de la enfermedad o del trastorno, tratamientos previos, la salud general o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes.

Según otro aspecto, se pueden prever uno o más kits en partes por el experto en la técnica, los kits en partes para llevar a cabo al menos uno de los métodos descritos en este documento, el kit en partes que comprende dos o más composiciones, las composiciones que comprenden solas o en combinación una cantidad eficaz de las composiciones descritas en el presente documento de acuerdo con al menos uno de los métodos mencionados anteriormente.

Los kits incluyen posiblemente también composiciones que comprenden agentes activos, identificadores de un evento biológico u otros compuestos identificables por un experto en la materia tras la lectura de la presente descripción. El kit también puede comprender al menos una composición que comprende una cantidad eficaz de las composiciones descritas en este documento o una línea celular. Las composiciones y la línea celular de los kits en partes que se utilizan para realizar el método de al menos un método en la presente memoria se da a conocer según el procedimiento de identificación por una persona experta en la técnica.

Tal como se utiliza en este documento, el término "polipéptido" se refiere a cualquier multímero o polímero de restos de aminoácidos. Un polipéptido puede estar compuesto de dos o más cadenas polipeptídicas. Un polipéptido incluye una proteína, un péptido y un oligopéptido. Un polipéptido puede ser lineal o ramificado. Un polipéptido puede comprender restos de aminoácidos modificados, análogos de aminoácidos o restos de aminoácidos de origen no natural y puede estar interrumpido por restos que no sean aminoácidos. Se incluyen dentro de la definición polímeros de aminoácidos que han sido modificados, ya sea de forma natural o mediante una intervención, por ejemplo, por la formación de un enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, metilación, acetilación, fosforilación o mediante una manipulación, tal como la conjugación con un componente de marcaje.

Tal como se utiliza en este documento, la expresión "unión específica" se refiere a la interacción entre pares de unión (por ejemplo, un anticuerpo y un antígeno). En varios casos, la unión específica se puede realizar mediante una constante de afinidad de aproximadamente 10^6 moles/litro, aproximadamente 10^7 moles/litro, o alrededor del 10^8 moles/litro, o menos.

Vacunas contra el cáncer de la invención

Una realización de esta invención es un método para el tratamiento del cáncer mediante la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de una composición inmunológica que contiene ya sea Globo H o un fragmento del mismo (por ejemplo, el antígeno-3 específico de la etapa embrionaria (SSEA-3, también conocido como Gb5), o SSEA-4) y un adyuvante. Los tipos de cáncer objetivo incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama (incluyendo las etapas 1-4), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas), cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer bucal, cáncer de estómago (incluyendo T1-T4), cáncer de colon, cáncer de nasofaringe, cáncer de piel, cáncer de riñón, tumor cerebral (por ejemplo, astrocitoma, glioblastoma multiforme y meningioma), cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de vejiga y de endometrio, rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, leiomyosarcoma y tumor del estroma gastrointestinal.

Los cánceres clasificados por sitio incluyen el cáncer de la cavidad oral y de la faringe (labio, lengua, glándulas salivales, piso de la boca, encías y otra parte boca, nasofaringe, amígdalas, orofaringe, hipofaringe, otras vías orales/faringe); cánceres del sistema digestivo (esófago, estómago, intestino delgado, colon y recto; ano, conducto anal y anorrectal; hígado; conducto biliar intrahepático; vesícula biliar; otros biliares; páncreas; retroperitoneo; peritoneo, epiplón y mesenterio; otras partes del digestivo); cánceres del aparato respiratorio (cavidad nasal, oído medio y senos paranasales, laringe, pulmón y bronquios; pleura, tráquea, mediastino y otras partes del respiratorio); cánceres de mesotelioma; huesos y articulaciones; y del tejido blando, incluyendo el corazón; cánceres de piel, incluyendo melanoma y otros cánceres de piel no epiteliales; sarcoma y cáncer de mama de Kaposi; cáncer del sistema genital femenino (cuello del útero, cuerpo uterino; útero, NEP; ovario; vagina; vulva; y otras partes del sistema genital femenino); cánceres del aparato genital masculino (próstata, testículos, pene y otras partes del sistema genital masculino); cánceres del sistema urinario (vejiga urinaria; riñón y pelvis renal; uréter; y otras partes del sistema urinario); cánceres del ojo y de la órbita; cánceres del cerebro y del sistema nervioso (cerebro, y otras partes del sistema nervioso); cánceres del sistema endocrino (glándula tiroidea y otras partes del sistema endocrino, incluyendo el timo); linfomas (enfermedad de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin), mieloma múltiple y leucemia linfocítica (leucemia, leucemia mieloide, leucemia monocítica y otras leucemias).

Otros tipos de cáncer, clasificados por el tipo histológico, que pueden ser dianas adecuadas para las vacunas contra el cáncer de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, neoplasia, maligna; carcinoma, NEP; carcinoma indiferenciado, NEP; carcinoma de células fusiformes y gigante; carcinoma de células pequeñas, NEP; carcinoma papilar, NEP; carcinoma de células escamosas, NEP; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales, NEP; carcinoma Pilomatrix; carcinoma de células transicionales, NEP; carcinoma de células transicionales

papilar; adenocarcinoma NEP; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular, NEP; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma de pólipos adenomatosos; adenocarcinoma, poliposis familiar; carcinoma sólido, NEP; tumor carcinoide maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar, NEP; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma de células oxífilas; carcinoma de basófilos; adenocarcinoma de células claras, NEP; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular, NEP; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma de la corteza suprarrenal; carcinoma endometriode; carcinoma de apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistoadenocarcinoma, NEP; cistoadenocarcinoma papilar, NEP; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistoadenocarcinoma mucinoso, NEP; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular, NEP; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma w/metaplasia escamosa; timoma maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tcoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; androblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células de los lípidos, maligno; paraganglioma maligno; paraganglioma extra-mamario maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno, NEP; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en nevo gigante pigmentado; melanoma de células epitelioides; nevo azul, maligno; sarcoma, NEP; fibrosarcoma, NEP; histiocitoma fibroso maligno; mixosarcoma; liposarcoma, NEP; leiomiomasarcoma, NEP; rabiomiosarcoma, NEP; rabiomiosarcoma embrionario; rabiomiosarcoma alveolar; sarcoma del estroma, NEP; tumor mixto maligno, NEP; tumor mülleriano mixto; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma, NEP; mesenquimoma, maligno; tumor maligno de Brenner; tumor filoides malignos; sarcoma sinovial, NEP; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario, NEP; teratoma maligno, NEP; estruma ovárico, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma, NEP; osteosarcoma juxtacortical; condrosarcoma, NEP; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimal; tumor de células gigantes del hueso; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma maligno; ependimoma, NEP; astrocitoma, NEP; astrocitoma protoplasmática; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma, NEP; oligodendroglioma, NEP; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso, NEP; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma, NEP; retinoblastoma, NEP; tumor neurogénico olfativo; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma, maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno, NEP; enfermedad de Hodgkin, NEP; enfermedad de Hodgkin; paragranuloma, NEP; linfoma maligno, linfoma linfocítico pequeño; linfoma maligno de células grandes, difuso; linfoma maligno, folicular, NEP; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin específicos, histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia, NEP; leucemia linfoide, NEP; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células de linfosarcoma; leucemia mieloide, NEP; leucemia basófila; leucemia eosinófila; leucemia monocítica, NEP; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas.

El término "tratar", como se usa en este documento, se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un sujeto, que tiene cáncer, un síntoma de cáncer, o una predisposición hacia el cáncer, con el fin de curar, sanar, aliviar, aplacar, alterar, remediar, calmar, mejorar o afectar el cáncer, los síntomas del cáncer, o la predisposición hacia el cáncer. "Una cantidad efectiva", como se usa en este documento, se refiere a la cantidad de cada agente activo requerida para conferir el efecto terapéutico en el sujeto, ya sea solo o en combinación con uno o más de otros agentes activos. Las cantidades eficaces varían, como se reconoce por los expertos en la técnica, dependiendo de la vía de administración, el uso de excipiente y la utilización conjunta con otros agentes activos.

La composición inmune usada en el método descrito anteriormente puede contener un glicano (es decir, una molécula que contiene un resto de azúcar) que es Globo H o un fragmento del mismo y un adyuvante. Globo H es un glicano que contiene el epítipo hexasacárido ($Fu\alpha 1 \rightarrow 2 Gal\beta 1 \rightarrow 3 GalNAc\beta 1 \rightarrow 3 Gal\alpha 1 \rightarrow 4 Gal\beta 1 \rightarrow 4 Glc$), y opcionalmente, un resto no de azúcar. Su fragmento es un glicano que contiene un fragmento del epítipo hexasacárido y, en su caso, el resto no de azúcar. Estos oligosacáridos se pueden preparar por métodos de rutina. (Véase Huang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 15-20 (2006)). Si se desea, pueden estar unidos a un resto no de azúcar.

La solicitud principal, solicitud de patente EE.UU. No. Ser. 12/485.546, se basó en los descubrimientos inesperados de que (1) SSEA-3, el precursor inmediato de Globo H, se expresa a un alto nivel en las células madre del cáncer de mama y, por lo tanto, puede servir como una diana adecuada para el tratamiento del cáncer de mama, y (2) α -galactosil-ceramida (α -GalCer) es un adyuvante eficaz que promueve la producción de anticuerpos anti-Globo H y anti-SSEA-3.

La solicitud de patente EE.UU. No. Ser. 12/485.546 ofrece una composición inmunológica que contiene Globo H o su fragmento (por ejemplo, SSEA-3) y un adyuvante (por ejemplo, α -GalCer). Globo H o su fragmento puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH). Cuando se administra en un sujeto (por ejemplo, un ser humano), esta composición inmunológica provoca respuestas inmunes (por ejemplo, la producción de anticuerpos) dirigidos a Globo H o su fragmento y, por lo tanto, es eficaz en el tratamiento del cáncer (por ejemplo, del cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de pulmón).

La solicitud de patente EE.UU. No. Ser. 12/485.546 se refiere a un método de producción de un anticuerpo específico para Globo H o su fragmento mediante su administración a un mamífero no humano (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, oveja o caballo), la composición inmune descrita anteriormente y el aislamiento a partir del anticuerpo de mamífero que se une a Globo H o su fragmento.

5 El Globo H u otros glicanos descritos en la presente descripción se conjuga a una proteína vehículo, tal como DT-CRM197. A continuación, se puede mezclar con un adyuvante, tal como C34, y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato, o una solución de bicarbonato) para formar una composición inmune (por ejemplo, una vacuna) a través de métodos convencionales. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; y 4.596.792. La composición
10 puede prepararse como soluciones inyectables, tales como líquidas, o emulsiones y el vehículo se selecciona con respecto al modo y a la vía de administración, así como con respecto a la práctica farmacéutica estándar. Los vehículos adecuados farmacéuticos y diluyentes, y las necesidades farmacéuticas para su uso, se describen en el Pharmaceutical Sciences de Remington. La composición inmune contiene preferiblemente α -GalCer como adyuvante. Otros ejemplos de adyuvante incluyen, pero no se limitan a, una toxina del cólera, enterotoxina termolábil
15 (LT) de *Escherichia coli*, liposomas, complejo inmunoestimulante (ISCOM) o secuencias inmunoestimulantes de oligodesoxinucleótidos (ISS-ODN). La composición también puede incluir un polímero que facilite la entrega in vivo. Véase Audran R. et al. Vaccine 21: 1250-5, 2003; y Denis-Mize et al. Cell Immunol, 225: 12-20, 2003. Cuando sea necesario, puede contener además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH para mejorar la capacidad de la composición para provocar
20 respuestas inmunes contra el resto de azúcar en Globo H o su fragmento. La composición inmune descrita en este documento se puede administrar por vía parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, inyección subcutánea o inyección intramuscular). Alternativamente, pueden ser deseables otros modos de administración, incluyendo supositorios y formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir los excipientes empleados normalmente
25 tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de sacarina, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 al 95% de la composición inmune descrita en este documento.

La composición inmune descrita en este documento se puede administrar por vía parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, inyección subcutánea o inyección intramuscular). Alternativamente, pueden ser deseables otros modos
30 de administración, incluyendo supositorios y formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de sacarina, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10 al 95% de la composición inmune
35 descrita en este documento.

La composición inmunológica se administra de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz, protectora e inmunogénica. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos y, si es necesario, para producir una respuesta inmune mediada por células. Las cantidades precisas de ingrediente activo
40 requeridas para ser administradas dependen del juicio del médico. Sin embargo, intervalos de dosificación adecuados son fácilmente determinables por cualquier experto en la técnica. Los regímenes adecuados para la administración de las dosis de refuerzo e iniciales son también variables, pero pueden incluir una administración inicial seguida de administraciones posteriores. La dosificación de la vacuna también puede depender de la vía de administración y varía de acuerdo con el tamaño del huésped.

45 La composición inmune de esta invención también se puede utilizar para generar anticuerpos en animales para la producción de anticuerpos, que pueden utilizarse tanto en el tratamiento como en el diagnóstico del cáncer. Los métodos para fabricar anticuerpos y fragmentos monoclonales y policlonales de los mismos en los animales (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, oveja o caballo) son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York. El término "anticuerpo" incluye
50 moléculas intactas de inmunoglobulina, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, Fv, scFv (anticuerpo de cadena sencilla), y dAb (anticuerpo de dominio; Ward, et al., (1989) *Nature*, 341, 544).

Globo H-DT-CRM 197 y vacunas relacionadas

Se sintetizaron Globo H y sus fragmentos mediante los métodos descritos en este documento. Para la conjugación de proteínas, se incubó el semi-éster de Globo H purificado con proteínas portadoras individuales como se muestra
55 en la figura 14.

Los conjugados de proteína-Globo H se caracterizaron por análisis de MALDI-TOF para determinar el número de moléculas de Globo H en cada proteína portadora. El número medio de la incorporación de Globo H aparece en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis MALDI-TOF de la incorporación de Globo H.

	Ref.	PM de la proteína	Después de la glicosilación ^a	Incorporación media (n)	Porcentaje de carbohidratos	
	GH-BSA	66431	66449	76029	8	14,4%
	GH-DT	58472	58326	62138	2 ~ 4	6,8%
	GH-TT	150682	155609	162902	6	4,5%
	GH-KLH*	8,6 × 10 ⁶			~ 700	14,7%
	GH- bambú	25 kD × 1600			N.D.	

^aPico m/z en MALDI-TOF; N.D.: no determinado; *GH-KLH fue proporcionado por Optimer Inc.

5 El conjugado KLH-GH mostró el mayor número en la incorporación de Globo H, sobre todo debido al mayor tamaño y al mayor número de restos Lys de la KLH. El mismo procedimiento de acoplamiento usando el enlazante p-nitrofenilo se aplicó también al virus del mosaico de bambú que contiene más de 100.000 restos de lisina en el revestimiento del virus. Sin embargo, la inestabilidad del virus, cuando reacciona en tampón fosfato de sodio (pH = 7,2) a 4°C es una preocupación importante para un desarrollo adicional. Además, el GH-16 BaMV limita su detección por análisis MALDI-TOF debido a su enorme tamaño.

10 El Globo H sintético y los fragmentos truncados (Fig. 1) se unen con un enlazante de pentilamina en los extremos reductores y son covalentemente inmovilizados sobre el portaobjetos de vidrio revestido con NHS. Nueve de los once oligosacáridos fueron seleccionados para ser impresos en la micromatriz.

Cada portaobjetos de micromatrices fue observado con 50 µM de nueve análogos de Globo H (SSEA-4, GH, Gb5, Gb4, Gb3, Gb2, BB4, BB3 y BB2), respectivamente en 12 repeticiones.

15 Para validar los hidratos de carbono en la micromatriz, se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón (VK9 y MBR1 para Globo H y anti-SSEA-3) y los respectivos anticuerpos secundarios (IgG e IgM anti-ratón de cabra) se utilizaron para examinar la especificidad de unión, y los resultados se muestran en la figura 2A-2C. Los datos sugirieron que VK9 y MBR1 ambos reconocían a Globo H y al tetrasacárido exterior de BB4, aunque MBR1 también reconoció a BB3 ligeramente. Además, el anticuerpo anti-SSEA-3 reconoce específicamente al antígeno de SSEA-3 (Gb5) sin ninguna reactividad cruzada. Los resultados indicaron que la micromatriz de Globo H se podría emplear para el perfil de especificidad y para la potencia de los anticuerpos policlonales de ratones inmunizados.

20 Como se dijo anteriormente, la inmunización de ratones con una vacuna totalmente sintética de Globo H co-administrada con QS-21 dio como resultado la generación de anticuerpos contra las células de cáncer de mama humano; sin embargo, los anticuerpos de ratón son principalmente IgM, incluso después de varias exposiciones a vacunas. (Ragupathi G, et al. (1997) *Angew Chem Int Ed* 36: 125-128).

25 Un grupo de ratones fueron inmunizados con 1 µg de conjugados sintéticos de Globo H con o sin el adyuvante glicolípido, α-GalCer (C1) por vía subcutánea. Se encontró que GH-KLH, GH-DT y GH-BV son los inmunógenos más eficaces para la inducción de IgM, seguido de GH-TT y GH-BSA, como se resume en la figura 3A, y α-GalCer es capaz de estimular la respuesta inmune para inducir altos niveles de anticuerpos de IgM. Una tendencia similar se observó también en los anticuerpos IgG de ratón (Fig. 3B), y los niveles de IgG relativos fueron más altos que los niveles de IgM. En resumen, a pesar de la densidad de hidratos de carbono inferior del glicoconjugado sintético, GH-DT presentaba una inmunogenicidad similar a GH-KLH, y el adyuvante α-GalCer fue mostrado que mejoraba la respuesta inmune.

35 Ya que se ha demostrado que β-GalCer es un adyuvante eficaz para GH-DT, se examinaron otros glicolípidos con mejor actividad adyuvante que C1 como se muestra en la figura 4. Se inmunizaron grupos de ratones con GH-DT y GH-BV con o sin glicolípidos. Se obtuvieron los sueros y se introdujeron en el análisis de micromatrices de glicanos. En general, los títulos de IgG de Globo H anti-ratón aumentaron cuando la inmunización procedía pero los niveles de IgM eran casi independientes de los tiempos de vacunación (Fig. 5). Entre los grupos vacunados con GH-BV, no hay diferencia significativa en el nivel de IgM entre el tratamiento glicolípido-vacuna y la vacuna sola. Aunque los resultados sugieren que GH-BV en combinación con glicolípido no era un régimen de inmunización eficaz, la pobre inmunogenicidad puede ser consecuencia de la característica inestable de BaMV. Sin embargo, los análogos de α-GalCer, especialmente 7DW8-5 cooperaron bien con GH-DT para inducir la respuesta inmune del ratón.

40 Curiosamente, los anticuerpos de IgG de ratón policlonales generados por GH-DT y diversos adyuvantes glicolípidos no sólo neutralizan Globo H sino que también una reacción cruzada con GB5, SSEA-4 y Gb4 y C34 (Fig. 6) parece ser el adyuvante glicolípido más eficaz (Fig. 7). Con el fin de buscar una nueva composición de vacuna que pueda inducir un título de IgG de IgM mucho más alto, se probaron el conjugado Globo H-DT y el glicolípido C1 o C34 o el adyuvante comercialmente disponible AlPO₄ (fosfato de aluminio) o MF59.

Sorprendentemente, Globo H-DT con el glicolípido C34 induce anticuerpos de IgG casi exclusivamente después de la 3ª vacunación (Fig. 7). Para resumir, el nuevo adyuvante glicolípido 7DW8-5 combinado con conjugados de GH-DT fue capaz de mejorar tanto los anticuerpos de IgG como de IgM de anti-Globo H, y el adyuvante glicolípido C34 combinado con GH-DT puede inducir un título de anticuerpo de IgG mucho más alto que IgM. También exhiben una diversa afinidad de unión frente a los antígenos SSEA-3 (GB5) y SSEA 4, ambos expresados específicamente en la superficie de las células madre de cáncer de mama.

Con el fin de comparar aún más el efecto de diferentes adyuvantes glicolípidos en la vacuna Globo H, se inmunizaron siete grupos de ratones con GH-KLH. Los resultados sugieren que los ratones vacunados con glicolípidos indujeron niveles más altos de anticuerpos anti-Globo H (Fig. 8). Aunque MF59 sea un adyuvante fuerte, no puede colaborar con GH-KLH para inducir anticuerpos contra Globo H. El AlPO_4 (fosfato de aluminio) tampoco mostró ningún efecto evidente en la inducción de anticuerpos. Por otro lado, GH-KLH junto con C34 mostró una inmunogenicidad superior, después de la primera y segunda vacunación, pero no mostró ninguna diferencia significativa en C1 después de la tercera vacunación. En general, estos hallazgos sugieren el potencial de los nuevos derivados de glicolípidos como adyuvantes para vacunas basadas en hidratos de carbono.

La naturaleza de la respuesta inmune celular y humoral está influenciada no sólo por las combinaciones de antígenos y adyuvantes, sino también por el vehículo y la vía de inmunización. Como se describe en Sesardic y col., DT-CRM197, una toxina mutante carente de actividad tóxica induce la proliferación de células T específicas de antígeno y eleva la producción de esplenocitos de IL-2, IFN- γ e IL-6, lo que sugiere su papel en la ruta dirigida de Th1 (Miyaji E S et al. (2001) *Infect Immun* 69: 869-874; Godefroy S, et al. (2005) *Infect Immun* 73: 4803 a 4809; Stickings P, et al. (2008) *Infect Immun* 76: 1766-1773). A pesar de que el perfil de citoquina era predominantemente Th1, las subclases de anticuerpos anti-CRM197 eran IgG1 sin IgG2a detectable, lo que sugiere una respuesta mixta Th1/Th2. Estos resultados llevaron a la evaluación del perfil de isotipo de anticuerpo de las vacunas Globo H, y los presentes estudios mostraron que la GH-DT o GH-KLH en combinación con adyuvantes glicolípidos indujeron principalmente el anticuerpo de IgG1 con una cantidad traza de IgG2a (Fig. 9).

A pesar del hecho de que los adyuvantes glicolípidos mejoran la secreción de citoquinas Th1 sesgadas cuando se administran solos por vía intravenosa (i.v.), no se observó el cambio de clase de anticuerpos (IgG2a). En general, los glicolípidos desempeñan un papel central en la mejora de la respuesta inmune tanto celular como humoral.

Vacunas contra el cáncer de Globo H, SSEA-3 y SSEA-4

Se sintetizaron y se analizaron SSEA-3 (Gb5) y SSEA-4 conjugados con DT. Después de la 3ª vacunación, los títulos de anticuerpos de IgM e IgG se compararon y se encontró que SSEA-3-DT y SSEA-4-DT también indujeron un título mucho más alto de IgG que de IgM (Fig. 10).

Ya que GH-DT y C34 indujeron anticuerpos para reconocer Globo H, GB5 y SSEA-4, la especificidad de vacunas de SSEA-3-DT y SSEA-4-dT en presencia de adyuvantes que utilizan una matriz de 24 glicanos fue examinada con especial atención en el estudio de la IgG (Fig. 11).

Como se muestra en la figura 12, los ratones inmunizados con anticuerpos inducidos por el adyuvante DT y C34 de Globo H que pueden reconocer Globo H, SSEA-3 (Gb5) y SSEA-4 con alta selectividad, y la vacuna de SSEA-3-DT con el adyuvante MF59 inducen una respuesta inmune alta con baja selectividad. Por otro lado, SSEA-3-DT combinado con el adyuvante C34 solamente indujo anticuerpos contra Globo H, SSEA-3 y SSEA-4.

Curiosamente, SSEA-4-DT (sialil-Gb5) en presencia o ausencia de adyuvantes indujo anticuerpos IgG e IgM que reconocen específicamente a SSEA-4 y a sus estructuras truncadas (SSEA-4 con eliminación de lactosa de cabeza). Sin estar ligado por la teoría, se postula que el ácido siálico es altamente inmunogénico y que induce una respuesta inmune altamente específica.

La inmunización de ratones con anticuerpos SSEA-3-DT-C34-inducidos reactivos con Globo H, SSEA-3 y SSEA-4, que sugiere que una vacuna basada en Globo H puede dirigirse a las células tumorales y a las células madre de cáncer de mama que expresan Globo H, SSEA-3 y SSEA-4.

La inmunización de ratones con Globo H-DT-C34 indujeron anticuerpos reactivos con Globo H, SSEA-3 y SSEA-4, lo que sugiere que una vacuna basada en Globo H puede dirigirse a las células tumorales y a las células madre de cáncer de mama que expresan Globo H, SSEA-3 y SSEA-4.

La inmunización de ratones con SSEA-4-DT indujo anticuerpos reactivos con SSEA-4, lo que sugiere que una vacuna basada en SSEA-4-DT puede dirigirse a las células tumorales y a las células madre de cáncer de mama que expresan SSEA-4.

Reducción del tamaño del tumor con vacunas contra el cáncer

A fin de evaluar directamente la eficacia de las vacunas de glicoconjugados sintéticos, los tamaños de los tumores se midieron tres veces por semana, como se muestra en la figura. 13. En general, el tumor crece 2 semanas después de la inyección con 4T1, llevando la línea celular de cáncer de mama un Globo H. Todos los grupos

vacunados junto con adyuvantes glicolípidos seguían mostrando una progresión tumoral comparativa menor en comparación con GH-DT solo y el control de PBS el día 24. Los datos sugieren que la vacunación con GH-DT y un adyuvante glicolípidos retrasaba en algún grado la progresión tumoral in vivo.

Expresión de SSEA-3 y SSEA-4 en cáncer de mama y CMCM

- 5 Se ha demostrado la expresión de Globo H en las CMCM, pero a una frecuencia menor que las no CMCM, y una mayor frecuencia de la expresión de SSEA-3 de que la expresión de Globo H en cáncer de mama y CMCM. (Chang W-W et al, (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105 (33): 11667-11672, incorporada en este documento por referencia en su totalidad).

- 10 Las características clínicas de 35 pacientes con cáncer de mama en los cuales se midieron la expresión de SSEA-3 o SSEA-4 se resumen en la Tabla 2. La mediana de edad fue de 48 años (rango de 31 a 82 años). Consistían en 1 en estadio 0, 10 en estadio I, 19 en estadio II y 5 en estadio III. La mayoría de las muestras de tumor tenían la patología de carcinoma ductal infiltrante (80,0%), con un 51,4% positivo para RE y un 65,7% positivo para el compromiso de los ganglios. En la Tabla 2, los intervalos de la expresión de SSEA-3 o SSEA-4 están representados por el porcentaje de células positivas dentro de las células totales de cáncer. Se utilizó una prueba t para el análisis estadístico de la expresión de SSEA-3 o SSEA-4 en relación con HER-2 o el estado de implicación nodal. La expresión de HER-2 se determinó por inmunohistoquímica. No hubo correlación significativa entre el nivel de expresión de SSEA-3 o SSEA-4 en los tumores y diversos factores clínico-patológicos, tales como el estadio (SSEA-4: P = 0,3498; SSEA-3: P = 0,9311), o HER-2 (SSEA-4: P = 0,0142; SSEA-3: P = 0,0128) (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con cáncer de mama.

Característica	No.	%	SSEA4	valor P	SSEA3	valor P
Pacientes que participaron	35	100				
Edad, años						
mediana	48					
Intervalo	31-82					
Tipo de tumor						
Carcinoma ductal infiltrante	28	80,0				
Carcinoma infiltrante lobular	1	2,8				
Carcinoma ductal in situ	1	2,8				
Carcinoma medular	1	2,8				
Carcinoma medular atípico	1	2,8				
Carcinoma metaplásico	2	6,0				
Carcinoma inflamatorio	1	2,8				
Estadio				0,7880		0,9311
0	1	2,9	33,1 (33,1)		1,4 (1,4)	
I	10	28,6	41,4 (0,5-69,1)		36,4 (0,0-55,9)	
II	19	54,3	39,3 (0,0-77,1)		30,9 (0,0-66,4)	
III	5	14,2	49,8 (7,7-70,7)		32,3 (0,0-36,1)	
Compromiso de los ganglios				0,0322		0,4925
Negativo	23	65,7	37,8 (0,0-69,1)		30,9 (0,0-66,4)	
Positivo	12	34,3	49,1 (17,4-77,1)		35,8 (0,0-60,7)	
ER				0,0142		0,0128
Negativo	18	51,4	36,2 (0,5-60,3)		29,7 (0,0-38,6)	
Positivo	17	48,6	48,5 (0,0-77,1)		40,0 (0,0-66,4)	

Las células tumorales primarias, aisladas de los pacientes incluidos, por digestión enzimática, se tiñeron con anticuerpos específicos para células CD45, CD24, CD44, y CD45⁺ fueron cerradas primero para eliminar los leucocitos. Para comparar la expresión de SSEA-3 o SSEA-4 entre las CMCM y las no CMCM, fueron separadas células tumorales CD45⁻ aún más en CMCM y no CMCM en base a sus expresiones de marcadores de superficie. Las CMCM fueron identificadas como células CD45⁻/CD24⁻/CD44⁺; el resto de la CD45⁻ población fueron consideradas como no CMCM.

Usando este enfoque, la expresión de SSEA-3 o SSEA-4 en las CMCM y en las no CMCM se evaluó en 35 muestras de tumores. En general, se detectó SSEA-4 en 34/35 (97,1%) y SSEA-3 en 27/35 (77,1%) de los tumores (Tabla 3). La expresión de SSEA4 o SSEA3 se determinó por citometría de flujo. Las CMCM se definieron como células CD45⁻ CD24⁻ CD44⁺ y las no CMCM se definieron como las poblaciones restantes de células CD45⁻. El intervalo se calculó como porcentaje de células positivas en las células totales.

Tal como se resume en la Tabla 3, entre las muestras de 27/35 (77,1%) que expresan SSEA-3, el porcentaje de células positivas varió de 1,4% a 66,4%. Las no CMCM aisladas de 25/35 tumores expresaron SSEA-3, estando el porcentaje de células positivas de 24,3% a 70,4%. En comparación, las CMCM de 23 de 35 tumores (65,7%) mostraron tinción positiva para SSEA-3, siendo el porcentaje de células positivas de 5,0% a 58,4%.

Entre las muestras 34/35 (97,1%) que expresan SSEA-4, el porcentaje de células positivas varió de 0,5% a 77,1%. Las no CMCM aisladas de 32/35 tumores expresaron SSEA-4, siendo el porcentaje de células positivas de 24,0% a 78,1%. En comparación, las CMCM de 31 de 35 tumores (88,6%) mostraron tinción positiva para SSEA-4, siendo el porcentaje de células positivas de 5,6% a 83,6%.

Tabla 3. Comparación de la expresión de SSEA4 y SSEA3 en CMCM y no CMCM

Población de glicanos	Nº. de pacientes	Positivo		
		Nº.	Tanto por ciento de células con expresión mediana (intervalo)	% del total
SSEA-4				
Total	35	34	41,4 (0,5-77,1)	97,1
No CMCM	35	32	43,7 (4,0-78,1)	91,4
CMCM	35	31	37,1 (5,6-83,6)	88,6
SSEA-3				
Total	35	27	36,4 (1,4-66,4)	77,1
No CMCM	35	25	40,5 (24,3-70,4)	71,4
CMCM	35	23	24,3 (5,0-58,4)	65,7

Expresión de SSEA-4 en CMCM

Para comparar la expresión de SSEA-4 entre las CMCM y no las CMCM, fueron separadas células tumorales CD45⁻ aún más en CMCM y no CMCM en base a sus expresiones de los marcadores de superficie. Las CMCM fueron identificadas como células CD45⁻/CD24⁻/CD44⁺; el resto de la población CD45⁻ fue considerada como no CMCM. La expresión de SSEA-4 dentro de cada una de estas dos poblaciones cerradas varió entre las muestras de tumor como se muestra en la figura 15. Por ejemplo, las CMCM del paciente BC0264, que representaban el 5,7% del total de las células tumorales aisladas, fueron negativas para SSEA-4, mientras que el 60,3% de las no CMCM expresó SSEA-4. Para el paciente BC0266, se detectó la expresión de SSEA-4 en 59,4% de las no CMCM y el 55,7% de las CMCM. Para el paciente BC0313, se detectó la expresión de SSEA-4 en el 32,4% de las no CMCM y el 83,6% de las CMCM. En total, se detectó SSEA-4 en 34/35 muestras (97,1%) ensayadas con el porcentaje de células positivas que van desde 0,5% a 77,1%. (Tabla 32).

Expresión de SSEA-3 y SSEA-4 en tejidos normales

Usando micromatrices de tejidos, la expresión de SSEA-4 se analizó entre 20 órganos diferentes por tinción inmunohistoquímica, como se muestra en la Tabla 4 (E, epitelial; C, tejido conectivo).

Tabla 4. Expresión de SSEA-4 en tejidos normales

Tejido normal	Antígeno	
	SSEA4	
Cerebro	0/5	
Hueso	0/5	
Ganglios linfáticos	0/5	
	E	C
Mama	1/5	0/5
Colon*	2/4	0/4
Esófago	0/5	0/5
Intestino	5/5	0/5
Riñón	2/5	0/5
Hígado	0/5	0/5
Pulmón	1/5	0/5
Ovario	1/5	0/5
Páncreas	1/5	0/5
Próstata	0/5	0/5
Recto	5/5	0/5
Piel	0/5	0/5
Bazo	0/5	0/5
Estómago	4/5	0/5
Testículos	4/5	0/5
Glándula timo	1/5	0/5
Cérvix uterino	1/5	0/5

5 SSEA-4 se expresa en las células epiteliales de diversos tejidos glandulares, tales como el de mama, colon, tracto gastrointestinal, riñón, pulmón, ovario, páncreas, recto, estómago, testículos, timo y cuello uterino (Tabla 4). Además, en una manera similar a Globo H y SSEA-3 (Chang WW et al, (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105 (33): 11667-11672), la expresión de SSEA-4 se limita principalmente al citoplasma o a la superficie apical de las células epiteliales que eran esencialmente inaccesibles para el sistema inmunitario, como se muestra en la figura 16.

10 En comparación, se expresa Globo H en las células epiteliales de diversos tejidos glandulares, tal como el de mama, tracto gastrointestinal, páncreas, próstata y cuello uterino. La distribución de SSEA3 es similar a la de Globo H excepto por su ausencia en tejidos normales de mama, pero su presencia en riñón, recto, testículos y timo, que fueron negativos para Globo H (Chang WW. Et al., (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105 (33): 11.667-11.672).

Ejemplos

15 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Se debe apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por lo tanto pueden considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y todavía obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu ni del alcance de la invención.

Métodos generales, materiales e instrumentación

Materiales

Se utilizaron disolventes y reactivos comerciales tal como se recibieron sin purificación adicional y fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Acros, Merck, Echo Chemical y Senn Chemical. El anticuerpo monoclonal Mbr1 se adquirió de productos bioquímicos ALEXIS, los anticuerpos de IgG anti-ratón Cy3-conjugado (IgG, IgG1 y IgG2a) y IgM eran de Jackson Immuno Research. La proteína DT-CRM197 y el toxoide tetánico se compraron en Merck y Adimmune, respectivamente. El adyuvante de gel de fosfato de aluminio (AlPO₄) se adquirió en Brenntag Biosector. El virus del bambú y el anticuerpo monoclonal VK9 se prepararon en el laboratorio del Dr. Lin y del Dr. Yu, respectivamente. Los derivados de los glicolípidos se sintetizaron y fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Wong.

Métodos generales

Los tamices moleculares (MS, AW-300) utilizados en las glicosilaciones se trituraron y se activaron antes de su uso. Las reacciones se controlaron con placas de TLC analíticas (gel de sílice 60 de PLC, F254, 2 mm, Merck) y se visualizaron con luz UV (254 nm) o por tinción con p-anisaldehído. La cromatografía en columna ultrarrápida se realizó sobre gel de sílice (de 40 a 63 micras) o LiChroprep RP18 (40-63 micras). La membrana de diálisis (éster de celulosa, MCCO = 10.000) se lavó con ddH₂O antes de su uso.

Instrumentación

La resonancia magnética nuclear de protones (¹H RMN), la resonancia magnética nuclear de carbono (¹³C RMN) se registraron con espectrómetros de RMN de Bruker Avance 600 (600 MHz / 150 MHz). Los desplazamientos químicos de los protones se reportan en ppm (escala δ) y se hace referencia al tetrametilsilano (δ = 0). Los desplazamientos químicos de carbono también se expresan en partes por millón (ppm, δ escala). DTO 135 (mejora de la distorsión menos por transferencia de polarización) se emplea para la determinación de la multiplicidad. Los datos se representan como sigue: desplazamiento químico, multiplicidad (s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuartete, m = multiplete, br = ancho), la integración y la constante de acoplamiento (J) en Hz. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron por BioTOF III y MALDI-TOF MS fue empleada por Ultraflex II TOF/TOF200.

Ejemplo 1

Síntesis de Globo H conjugado con diferentes proteínas portadoras

Globo H (1; véase la Fig. 11) y sus fragmentos 2-10 se sintetizaron mediante el uso de una estrategia con un recipiente programable (Huang C-Y, et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103: 15-20). La reacción de 1 se llevó a cabo con un enlazante homobifuncional eficiente en solución de DMF anhidro a temperatura ambiente (Wu X, et al. (2004) Org Lett 6: 4.407 hasta 4410; Wu X, Bundle DR (2005) J Org Chem 70: 7381-7388). La reacción se controló fácilmente por TLC. Una vez se produjo la desaparición de la amina libre con un producto de R_f mayor, la mezcla de reacción se evaporó para eliminar el DMF y se lavó con diclorometano y agua para eliminar la cantidad en exceso de enlazante. Finalmente, el producto se purificó por cromatografía en columna de fase inversa (C18) y se eluyó gradualmente con agua que contenía ácido acético al 1% a metanol al 40% en agua. La solución se sometió a liofilización para producir el producto de color amarillo claro 12. Por último, para la conjugación de proteínas, el semi-éster purificado de Globo H 12 (de 30 a 40 equiv) se incubó con proteínas individuales portadoras en tampón fosfato (10 mM, pH 7,2) durante 24 horas a temperatura ambiente (Fig. 14). Es importante destacar que la concentración de proteína debe ser ajustada a ~5 mg/mL para maximizar el acoplamiento de los restos de lisina con el semi-éster de Globo H. Después de 24 h, se diluyeron los glicoconjugados y se dializaron contra agua desionizada para eliminar el resto del grupo de p-nitrofenilo. La solución se sometió a liofilización hasta obtener un polvo blanco que proporcionó 13, 14 y 15.

Los conjugados de proteína-Globo H se caracterizaron por análisis de MALDI-TOF para determinar el número de moléculas de Globo H en cada proteína portadora. El número medio de la incorporación de Globo H se enumera en la Tabla 1 que se muestra más arriba.

Los glicoconjugados 13, 14, 15 se disolvieron en ddH₂O para dar una concentración final en torno a 1 pmol/μl. El ácido sinapínico fue seleccionado como una matriz y se mezcló con acetonitrilo recién preparado y agua desionizada (1:1 v/v) para hacer que la concentración de la matriz final 10 mg/ml incluyendo 0,1% de TFA. Cada muestra se detectó en un modo positivo lineal para obtener el espectro de m/z. El peso molecular de cada glicoconjugado se determinó por m/z. El glicoconjugado 14 mostró una heterogeneidad, lo que indica un promedio de 2~4 incorporaciones. El conjugado KLH-GH mostró el mayor número de incorporación de Globo H, sobre todo debido al mayor tamaño y más restos de Lys de KLH. El mismo procedimiento de acoplamiento usando el enlazante de p-nitrofenilo se aplicó también al virus del mosaico de bambú que contiene más de 100.000 restos de lisina en la cubierta del virus. Sin embargo, la inestabilidad del virus, cuando reacciona en tampón fosfato de sodio (pH = 7,2) a 4°C es una preocupación importante para el desarrollo adicional. Además, el GH-BaMV 16 limita su detección por análisis MALDI-TOF debido a su enorme tamaño. Por último, los glicoconjugados liofilizados fueron almacenados a -30°C y se reconstituyeron con agua estéril antes de la inmunización.

Ejemplo 2: Fabricación de micromatrices de glicano y validación

El Globo H sintético y los fragmentos truncados (Fig. 1) se unen con un enlazante de pentilamina en los extremos reductores y se inmovilizan covalentemente sobre el portaobjetos de vidrio revestido de NHS. Nueve de los once

oligosacáridos fueron seleccionados para ser impresos en la micromatriz. Se ensayaron concentraciones en serie de oligosacáridos (1, 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100 μM) para optimizar la intensidad de fluorescencia y la afinidad de unión. Cada portaobjetos de micromatrices fue detectado con 50 μM de nueve análogos de Globo H (SSEA-4, GH, GB5, Gb4, Gb3, GB2, BB4, BB3 y BB2), respectivamente en 12 repeticiones. Después de la reacción en 80% de humedad ambiente, los portaobjetos se almacenaron a temperatura ambiente en desecadores antes de su uso.

Para validar los hidratos de carbono en la micromatriz, los anticuerpos monoclonales de ratón (VK9 y MBR1 para Globo H, y anti-SSEA-3) y los respectivos anticuerpos secundarios (IgG e IgM de cabra anti-ratón) se utilizaron para examinar la especificidad de unión y los resultados se muestran en las figuras 2A-2C. Los datos sugieren que tanto VK9 como MBR1 ambos reconocieron Globo H y el tetrasacárido exterior BB4, aunque MBR1 también reconoció BB3 ligeramente (Gilewski T et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98: 3270 a 3.275; Huang C-Y, et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103: 15-20). Además, el anticuerpo anti-SSEA-3 reconoce específicamente el antígeno de SSEA-3 (GB5) sin ninguna reactividad cruzada. Los resultados indicaron que la micromatriz de Globo H se podría emplear para el perfil de especificidad y para la potencia de los anticuerpos policlonales de ratones inmunizados.

Ejemplo 3. Inmunización de ratones

En este estudio, un grupo de ratones se inmunizó con 1 μg de conjugates sintéticos de Globo H (GH) con o sin el adyuvante glicolípido, α -GalCer (C1) por vía subcutánea. Diez días después de tres vacunaciones a intervalos semanales, se recogieron los sueros de ratones y posteriormente se introdujeron en la micromatriz de glicano para evaluar los niveles de anticuerpos. Se encontró que GH-KLH, GH-DT y GH-BV son los inmunógenos más eficaces para la inducción de IgM, seguido de GH-TT y GH-BSA como se resume en la figura 3A, y α -GalCer es capaz de estimular la respuesta inmune para inducir altos niveles de anticuerpos de IgM. Una tendencia similar se observó también en los anticuerpos de IgG de ratón (Fig. 3B) y los niveles de IgG relativos fueron más altos que los niveles de IgM. En resumen, a pesar de la inferior densidad de hidratos de carbono del glicoconjugado sintético, GH-DT presentaba una inmunogenicidad similar a GH-KLH, y el adyuvante α -GalCer fue mostrado que mejoraba la respuesta inmune.

Ya que C1 se demostró que era un adyuvante eficaz para GH-DT, otros glicolípidos con mejor actividad adyuvante de C1 se examinaron como se muestra en la figura 4. (Fujio M, et al. (2006) J Am Chem Soc 128: 9022 a 9023).

Los grupos de ratones se inmunizaron por vía intramuscular con 1,6 μg de GH-DT y GH-BV con o sin 2 μg de glicolípidos dos veces a la semana. Se obtuvieron sueros dos semanas después de la tercera vacunación y se introdujeron en el análisis de micromatrices de glicano. En general, los títulos de IgG de anti-Globo H de ratón aumentaron según procedía la inmunización, pero los niveles de IgM fueron casi independientes de los tiempos de vacunación (Fig. 5). Entre los grupos vacunados con GH-BV, no hubo diferencia significativa en el nivel de IgM entre el tratamiento con glicolípido-vacuna y la vacuna sola. Aunque los resultados sugieren que GH-BV en combinación con glicolípido no era un régimen de inmunización eficaz, la pobre inmunogenicidad puede ser consecuencia de la característica inestable de BaMV. Sin embargo, los análogos de α -GalCer, especialmente 7DW8-5, cooperaron bien con GH-DT para inducir la respuesta inmune del ratón.

Curiosamente, los anticuerpos policlonales de IgG de ratón generados por GH-DT y diversos adyuvantes glicolípidos no sólo neutralizan Globo H sino que también reaccionan de forma cruzada con GB5, SSEA-4 y Gb4 (Fig. 6) y C34 parece ser el más eficaz (Fig. 6). Con el fin de buscar una nueva composición de vacuna que pueda inducir mucho más alto título de IgG que de IgM, se probaron el conjugado de Globo H-DT y el glicolípido C1 o C34 y el adyuvante AlPO_4 (fosfato de aluminio) comercialmente disponible o MF59. Sorprendentemente, Globo H-DT con el glicolípido C34 puede inducir anticuerpos IgG después de la 3ª vacunación (Fig. 7). En resumen, el nuevo adyuvante glicolípido 7DW8-5 combinado con conjugados de GH-DT fue capaz de mejorar tanto IgG como IgM anti-Globo H, y el adyuvante glicolípido C34 combinado con GH-DT pueden inducir un título de anticuerpo de IgG mucho más alto que IgM. También exhiben diversa afinidad de unión frente a los antígenos GB5 y SSEA 4, ambos expresados específicamente en la superficie de las células madre de cáncer de mama.

Con el fin de comparar aún más el efecto de diferentes adyuvantes glicolípidos en la vacuna de Globo H, fueron inmunizados siete grupos de ratones con GH-KLH. Los resultados sugieren que los ratones vacunados con glicolípidos indujeron niveles más altos de anticuerpos anti-Globo H (Fig. 8). Aunque MF59 es un adyuvante fuerte que no pudo colaborar con GH-KLH para inducir anticuerpos contra Globo H. AlPO_4 (fosfato de aluminio) tampoco mostró ningún efecto evidente en la inducción de anticuerpos. Por otro lado, GH-KLH junto con C34 mostró una inmunogenicidad superior, después de la primera y segunda vacunación, pero no mostró ninguna diferencia significativa en C1 después de la tercera vacunación.

DT-CRM197, una toxina mutante carente de actividad tóxica induce la proliferación de células T específicas de antígeno y eleva la producción de esplenocitos de IL-2, IFN- γ e IL-6, lo que sugiere su papel en la vía Th1 dirigida. (Miyaji EN et al. (2001) Infect Immun 69: 869-874; Godefroy S, et al. (2005) Infect Immun 73: 4803 a 4809; Stickings P, et al. (2008) Infect Immun 76: 1766-1773). A pesar de que el perfil de citoquina era predominantemente Th1, las subclases de anticuerpos anti-CRM197 eran IgG1 sin IgG2a detectable, lo que sugiere una respuesta mixta de Th1/Th2. Estos resultados llevaron a la evaluación del perfil de isotipo del anticuerpo de las vacunas de Globo H, y

los presentes estudios mostraron que GH-DT o GH-KLH en combinación con adyuvantes glicolípidos indujeron principalmente el anticuerpo de IgG1 con una cantidad traza de IgG2a (Fig. 9).

5 A pesar del hecho de que los adyuvantes glicolípidos mejoran la secreción de citoquinas Th1 sesgadas cuando se administran solos por vía intravenosa (i.v.), no se observó ningún cambio de clase de anticuerpos (IgG2a). En general, los glicolípidos desempeñan un papel central en la mejora de la respuesta inmune tanto celular como humoral.

GB5 y SSEA-4 conjugados con DT también se sintetizaron mediante la misma estrategia. Después de la 3ª vacunación, el título de los anticuerpos de IgM e IgG se comparó y se encontró que GB5-DT y SSEA-4-DT inducían también títulos mucho más altos de IgG que de IgM (Fig. 10).

10 Ejemplo 4. Estudios de especificidad de los anticuerpos inducidos por la diferente composición de la vacuna

Ya que GH-DT y C34 inducían anticuerpos para reconocer Globo H, GB5 (SSEA-3) y SSEA-4, la especificidad de las vacunas SSEA-4-DT y SSEA-3-DT en presencia de adyuvantes utilizando una matriz de 24 glicanos con enfoque en el estudio de IgG fueron examinados a continuación (Fig. 11).

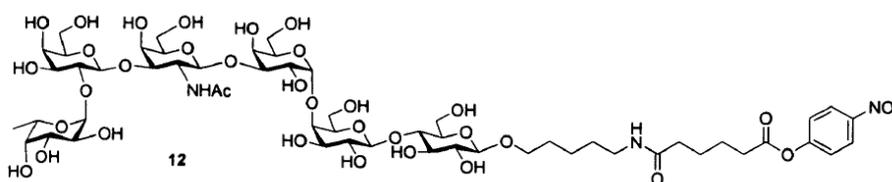
15 Como se muestra en la figura 12, los ratones inmunizados con Globo H-DT y el adyuvante C34 indujeron anticuerpos que pueden reconocer Globo H, SSEA-3 (GB5) y SSEA-4 con alta selectividad, y la vacuna de SSEA-3-DT con el adyuvante MF59 indujeron una alta respuesta inmune con baja selectividad. Por otro lado, SSEA-3-DT combinado con el adyuvante C34 solamente indujo anticuerpos contra Globo H, SSEA-3 y SSEA-4.

20 Curiosamente, SSEA-4-DT en presencia o ausencia de adyuvantes indujeron los anticuerpos de IgG e IgM que reconocen específicamente a SSEA-4 y sus estructuras truncadas (SSEA-4 con eliminación de lactosa de cabeza). Sin embargo, no está claro el origen de la selectividad.

25 A fin de evaluar directamente la eficacia de las vacunas sintéticas de glicoconjugados, se midieron los tamaños de los tumores tres veces por semana como se muestra en la figura. 13. En general, el tumor crece 2 semanas después de la inyección con 4T1, una línea celular de cáncer de mama que porta Globo H. Todos los grupos vacunados junto con los adyuvantes glicolípidos seguían mostrando una progresión tumoral comparativa menor en comparación con GH-DT solo y el control de PBS en el día 24. Los datos preliminares sugieren que la vacunación con GH-DT y un adyuvante glicolípidos en efecto retrasaba en algún grado la progresión tumoral in vivo.

Ejemplo 5. Preparación del semi-éster de Globo H

El semi-éster de Globo H se preparó como sigue:

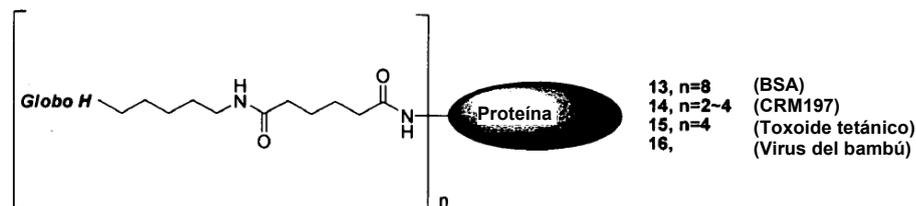


30 Semi-éster de Globo H (12)

35 La amina de Globo H 1 (5 mg, 4,54 μ mol) se disolvió en solución de DMF anhidro. Después, se añadió el enlazante éster de p-nitrofenilo (8,8 mg, 22,7 μ mol) y se agitó durante 1-3 horas a temperatura ambiente. La reacción se controló por TLC (1% de AcOH en metanol) y prueba de ninhidrina. La desaparición de la amina libre con un producto de R_f mayor indica la finalización de la reacción. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida sin calentar para eliminar el DMF, y después se extrajo con CH_2Cl_2 y agua que contenía 1% de ácido acético dos veces. La solución acuosa se concentró y purificó por cromatografía en columna de fase inversa (C18), y se eluyó gradualmente con H_2O que contenía 1% de ácido acético para $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 4:6$. La solución se sometió a liofilización hasta obtener un producto sólido de color amarillo claro 12 (5,4 mg, rendimiento del 88%) ^1H RMN (600 MHz, D_2O) δ 8,25 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,28 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 5,12 (d, 1H, J = 3,9 Hz), 4,79 (d, 1H, J = 3,7 Hz), 4,51 (d, 1H, J = 7,7 Hz), 4,44 (d, 1H, J = 7,7 Hz), 4,39 (d, 1H, J = 7,7 Hz), 4,31-4,28 (t, 2H, J = 7,7 Hz), 04,15-04,11 (m, 2H), 3,99 (d, 1H, J = 2,0 Hz), 3,92 (d, 1H, J = 2,8 Hz), 3,89-3,44 (m, 33H), 3,16 (t, 1H, J = 8,6 Hz), 3,10 (t, 2H, J = 6,7 Hz), 2,62 (t, 2H, J = 6,9 Hz), 2,20 (t, 2H, J = 6,6 Hz), 1,93 (s, 3H), 1,62-1,49 (m, 4H), 1,54-1,48 (m, 2H), 1,45-1,40 (m, 2H), 1,30-1,24 (m, 2H), 1,11 (d, 3H, J = 6,5 Hz) ^{13}C RMN (150 MHz, D_2O) δ 178,0, 176,1, 176,0, 156,9, 147,1, 127,3, 124,5, 105,7, 105,0, 103,7, 103,6, 102,2, 101,0, 80,5, 80,0, 78,9, 78,0, 77,8, 77,1, 76,7, 76,4, 76,3, 76,2, 75,2, 74,6, 73,8, 73,5, 72,5, 72,1, 71,8, 71,2, 70,9, 70,8, 70,1, 69,7, 69,5, 68,5, 62,6, 62,6, 62,0, 62,0, 61,7, 53,3, 40,8, 37,1, 35,0, 30,0, 29,7, 26,4, 25,0, 24,1, 23,9, 17,0 HRMS: $\text{C}_{55}\text{H}_{87}\text{N}_3\text{O}_{35}\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calculado: 1372,5018; encontrado: 1372,5016.

Ejemplo 6. Procedimiento general para la generación de glicoconjugados

Los glicoconjugados se fabricaron de la siguiente manera:



BSA, DT-CRM197 y el toxoide tetánico (Adimmune, Taiwan) se disolvieron en 100 mM de tampón de fosfato de pH 7,2 (5 mg/ml), y de 30 a 40 equivalentes del semi-éster de Globo H 35 se añadieron a la solución. La mezcla se agitó suavemente durante 24 h a temperatura ambiente. Después se diluyó la mezcla con agua desionizada y se dializó frente a 5 cambios de agua desionizada. La solución se sometió a liofilización hasta obtener un polvo blanco. Los conjugados de Globo H-proteína obtenidos se pueden caracterizar mediante análisis de MALDI-TOF para determinar la velocidad de incorporación de carbohidratos. 41 (GH-BSA), MALDI-TOF encontrado 76029, 42 (GH-DT-CRM 197) encontrado 62138, 43 (GH-TT) encontrado 162902, 44 (GH-BaMV) no se determinó.

10 Ejemplo 7 Análisis MS MALDI-TOF de glicoconjugados

Los glicoconjugados 41, 42, 43 y las proteínas portadoras primarias se reconstituyeron con ddH₂O (~1 µg/µl). La matriz, el ácido sinapínico, fue recién preparado con acetonitrilo y agua desionizada 1:1, por lo que la concentración de la matriz final fue 10 mg/ml incluyendo 0,1% de TFA. Se cargaron y se mezclaron la solución de matriz y los glicoconjugados suavemente y luego se secó al aire la placa. La calibración fue imprescindible al usar albúmina sérica bovina antes de la medición. Cada muestra de glicoconjugado y de proteína primaria se detectó en el modo positivo lineal. El peso molecular medio permite el cálculo de la media de los hidratos de carbono incorporados en la proteína portadora.

Ejemplo 8. Fabricación de micromatrices de glicanos

Se imprimieron micromatrices (BioDot, Cartesian Technologies, EE.UU) mediante deposición con pasador robótico (SMP3, TeleChem International Inc., EE.UU), de ~0,7 nl de varias concentraciones de glicanos que contienen aminos en tampón de impresión (tampón fosfato 300 mM, pH 8,5 que contiene 0,005% de Tween-20) a partir de un portaobjetos de vidrio revestido con NHS de 96 pocillos. Cada portaobjetos de micromatrices fue observado con 50 mM de nueve análogos de Globo H (SSEA-4, GH, GB5, Gb4, Gb3, GB2, BB4, BB3 y BB2), respectivamente en 12 repeticiones. Los portaobjetos impresos se dejaron reaccionar en una atmósfera de 80% de humedad durante una hora seguido de una desecación de la noche a la mañana. Estos portaobjetos se almacenan a temperatura ambiente en un desecador antes de utilizar.

Ejemplo 9. Ensayo serológico (micromatrices de glicanos)

Se diluyeron 1:60 sueros de ratones con 0,05% de Tween 20 en 3% de tampón BSA/PBS (pH 7,4) como el cribado preliminar. La micromatriz de glicano se bloqueó con etanolamina 50 mM durante 1 h, y se lavó dos veces con ddH₂O y tampón PBS antes de utilizarse. Las diluciones de suero fueron entonces introducidas en la micromatriz de Globo H, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Los portaobjetos de las micromatrices se lavaron otras tres veces con PBST (0,05% de Tween-20 en tampón de PBS) y tampón de PBS, respectivamente. A continuación, se añadió IgG anti-ratón de cabra de Cy3-AffiniPure (H + L), IgG1, IgG2a o IgM anti-ratón a los portaobjetos de las micromatrices y después se sellaron para una incubación de 1 hora a temperatura ambiente. Por último, los portaobjetos se lavaron tres veces con PBST, PBS y ddH₂O en secuencia. Los portaobjetos de las micromatrices fueron secados antes del escaneado a 532 nm con un lector de chips de fluorescencia de micromatrices (Genepix 4000B). Los datos fueron analizados mediante el software GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments, Union City, Calif., EE.UU.). Para adquirir la medición precisa, la ganancia de PMT se ajustó a 400 evitando la saturación de fluorescencia. La línea de fondo local fue sustraída de la señal en cada punto de glicano. Se omiten los puntos con defectos obvios o no hay señal detectable. La intensidad de fluorescencia máxima se define como el promedio de las "medianas de F532 nm-B532 nm" de manchas replicadas.

Ejemplo 10. Ensayo serológico (Inmuno ensayo ligado a enzima)

0,2 µg de Globo H-ceramida en 100 µl de tampón de bicarbonato de carbonato (pH 10) fue revestido en placas de 96 pocillos (NUNC) a 4°C durante toda la noche. Se lavaron con PBS y se bloquearon con 3% de albúmina de suero bovino durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones seriadas de suero de los ratones en cada pocillo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, seguido de lavado con DPBST (solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco, 0,05% Tween 20). Se añadió y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente IgG-AP anti-ratón de cabra (1:200, Southern Biotech, EE.UU.). Las placas se lavaron con PBST cinco veces y después se incubaron con sustrato de fosfatasa alcalina, fosfato de p-nitrofenilo (Sigma) durante 8 minutos a 37°C. Después de la incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de solución de NaOH 3 M y las placas se

leyeron a 405 nm en el lector ELISA (SpectraMax, Molecular Devices). El título se definió como la dilución más alta que da una densidad óptica superior a 0,1.

Ejemplo 11. Dosificación e inmunización

- 5 (1) Se administraron grupos de tres ratones (ratones hembras C57BL/6 de 6 semanas de edad, BioLASCO, Taiwán) por vía subcutánea a la región del abdomen con GH-KLH (Optimer Inc.), GH-BSA, GH-TT, GH-CRM 197 y GH-BaMV, respectivamente, con o sin adyuvante glicolípido C1 o 7DW8-5 por tres veces con intervalos de una semana. Cada vacuna contenía 1 µg de Globo H y con o sin 2 µg de adyuvante glicolípido. Los ratones control fueron inyectados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) solamente. Los ratones se sangraron antes de la primera inmunización (pre-inmune) y diez días después de la tercera inmunización. (2) Se inmunizaron grupos de 10 tres ratones (ratones Balb/c hembra de 8 semanas de edad, BioLASCO, Taiwan) por vía intramuscular tres veces en dos semanas de intervalo con GH-BaMV o GH-CRM197 con o sin C1, C23, o 7DW8-5, respectivamente. Cada vacuna contenía 1,6 µg de Globo H y con o sin 2 µg de adyuvante. Los ratones control fueron inyectados con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los ratones fueron sangrados antes de la inmunización y 2 semanas después de cada vacunación. (3) Fueron inmunizados grupos de tres ratones (ratones Balb/c hembra de 8 semanas de edad, BioLASCO, Taiwan) con GH-CRM197 o GH-KLH con o sin adyuvante C1, C17, 7DW8-5, C30, AIPO₄, MF59 (mezcla 1:1) como (2) describió. Todos los sueros se obtuvieron por centrifugación a 4000 g durante 10 minutos. Las respuestas serológicas fueron analizadas por micromatriz de glicano o comparadas con el ensayo ELISA convencional.

Ejemplo 12. Modelo de xenoinjerto

- 20 (1) Cinco grupos de ratones Balb/c inmunizados hembra (PBS, GH-CRM197 solo o con C1, C23 y 7DW8-5, respectivamente) fueron inyectados con 2×10^5 líneas celulares de tumor mamario de ratón metastásico, 4T1 (en PBS estéril) por vía subcutánea 8 semanas después de la vacunación final. (2) Se inyectaron siete grupos de ratones inmunizados hembra Balb/c (GH-KLH solo o con C1, C17, 8-5, C30, AIPO₄ y MF59, respectivamente) con 2×10^5 líneas celulares de tumor mamario de ratón metastásico, 4T1 (en PBS estéril) por vía subcutánea y 6 semanas 25 después de la vacunación final. Los sueros anti-Globo H de ratón fueron controlados antes y después de los xenoinjertos de tumores. El tamaño del tumor de ratón se midió mediante un calibrador Vernier tres veces por semana y se define como $(\text{longitud} \times \text{altura} \times \text{anchura})/2$ (mm³).

Ejemplo 13. Aislamiento de células tumorales primarias a partir de muestras de cáncer de mama humano

- 30 Se obtuvieron especímenes de cáncer de mama humano de pacientes que se habían sometido a cirugía inicial en el Hospital General Tri-Service (Taipei, Taiwán). Las muestras estaban totalmente codificadas para proteger la confidencialidad del paciente y se utilizaron bajo un protocolo aprobado por el Comité de Ética del Comité de Sujetos Humanos de Investigación Ética de la Academia Sinica, Taipei, Taiwán. Las muestras de tumores se cortaron en fragmentos cuadrados de 1 mm² y se sometieron a digestión enzimática por incubación en medio RPMI 1640 que contienen colagenasa (1000 U/ml), hialuronidasa (300 U/ml) y ADNasa I (100 µg/ml) a 37°C durante 2 h. Se 35 recogieron células de tumor primario de mama después de la filtración a través de un filtro de células de 100 µm (BD Biosciences) y se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de FBS.

Ejemplo 14. Análisis de citometría de flujo

- 40 Se prepararon células de cáncer de mama primario como 1×10^5 células en 50 µl de PBS que contenía FBS al 2% y NaN₃ al 0,1%. Las células se marcaron con mezclas de anticuerpos anti-CD24-PE, anti-CD44-CPA, y CD45-PerCP-Cy5.5 (1 µl de cada uno). La expresión de Globo H se detectó por tinción con anticuerpo anti-Globo H monoclonal (VK-9) conjugado con Alexa488. Los análisis se realizaron en un citómetro de flujo FACSCanto (Becton Dickinson). Las CMCM se definieron como células CD45⁺/CD24⁻/CD44⁺, y las no CMCM se definieron como otras poblaciones de células CD45⁻. La expresión de Globo H se analizó adicionalmente en la región acotada.

Ejemplo 15. Clasificación celular

- 45 Las células recogidas de tumor de mama humano injertado en ratones fueron teñidas con mezclas de anticuerpos anti-CD24-PE, anti-CD44-CPA y anti-H2K^d-FITC (BD Biosciences). Por fluorescencia activada de células de anticuerpo marcado se llevó a cabo la clasificación en un clasificador de células FACSria (Becton Dickinson). Fueron clasificadas células H2K^d/CD24⁻/CD44⁺ como las CMCM, y otras poblaciones de células H2K^d se clasifican como no CMCM. Las perezas típicas de las CMCM y las no CMCM fueron > 85% y > 90%, respectivamente.

50 Ejemplo 16. Inmunohistoquímica

- Para la expresión de SSEA-4 de los tejidos normales, se utilizaron portaobjetos de micromatrices de tejidos (Biomax) que contenían 20 órganos diferentes, con cada órgano derivado de cinco individuos. Los portaobjetos se secaron durante la noche a 56°C, se desparafinaron en xileno y se rehidrataron de acuerdo con los procedimientos histopatológicos estándar, seguido de la recuperación de antígenos con solución de AR-10 de pH 9,0 (BioGenex Laboratories). Se determinó la expresión de SSEA-4 con el uso del anticuerpo anti-SSEA-4 (eBioscience). La tinción de SSEA-4 se detectó mediante el uso de anti-IgM de rata como anticuerpo secundario y fue desarrollado por el 55

5 sustrato DAB. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina. Se fijaron BC0145 de tumor de mama primario y tumor de xenoinjertos de ratones NOD/SCID en formalina al 10% tamponada con fosfato y se embebieron en parafina. Las secciones de parafina se cortaron a un espesor de 2 μ M, se montaron en portaobjetos de microscopía SuperFrost Plus (Menzel-Gläser) y se secaron durante la noche a 55°C. Las secciones se desparafinaron en xileno y se rehidrataron de acuerdo con los procedimientos histopatológicos estándar, seguido por tinción con hematoxilina y eosina (H & E). Antes de la inmunotinción, los portaobjetos se colocaron primero en la solución de tampón de citrato de 10 mmol/L (pH 6,0) y se calentaron durante 15 min. Los portaobjetos se incubaron a continuación durante la noche con anti-ER, o anticuerpo anti-PR. La inmunodetección se realizó con el sistema de detección IHC de Super Sensitive Polymer-HRP (BioGenex).

10

REIVINDICACIONES

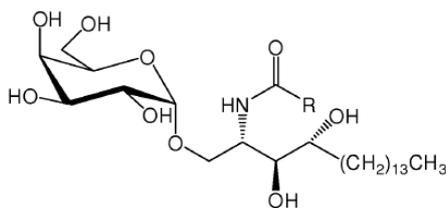
1. Una composición inmunogénica que comprende:

5 (a) un glicano que consiste esencialmente en Globo H, el antígeno-3 específico de la etapa embrionaria (SSEA-3. Gb5) y el antígeno-4 específico de la etapa embrionaria (SSEA-4, sialil-Gb5), Bb4, o un fragmento inmunogénico del mismo, en el que el glicano que se conjuga con una proteína portadora es el material 197 que presenta reacción cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM197) o el toxoide de la difteria, a través de un enlazante; y

(b) un adyuvante de α -galactosil-ceramida (α -GalCer).

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que la proteína portadora es el material 197 que presenta reacción cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM197).

10 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 ó 2, en la que el adyuvante tiene la siguiente estructura:



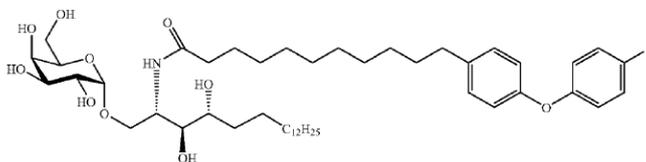
en la que R es $(CH_2)_{24}CH_3$, $(CH_2)_7PhF$, $(CH_2)_{10}PhOPhF$ o $(CH_2)_{10}PhF$.

4. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que R es $(CH_2)_{10}PhOPhF$.

5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, que comprende:

15 (a) Globo H conjugado con una proteína portadora que es el material 197 que presenta reacción cruzada con la toxina de la difteria (DT-CRM197);

(b) un adyuvante que es:



20 6. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el enlazante es un enlazante de p-nitrofenilo.

7. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento del cancer.

8. La composición inmunogénica para uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer intestinal, 25 cáncer colorectal, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de vesícula, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de la cavidad oral, cáncer bucal, cáncer de la nasofaringe, cáncer de la orofaringe, cáncer laríngeo, cáncer dérmico o tumor cerebral.

9. La composición inmunogénica para uso en el tratamiento de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el cáncer es cáncer de mama.

30 10. Una vacuna que comprende:

(a) una composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y

(b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

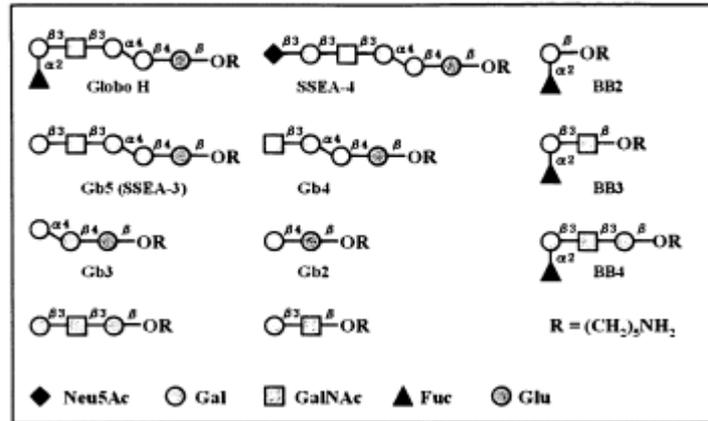


Figura 2A

Figura 2B

Figura 2C

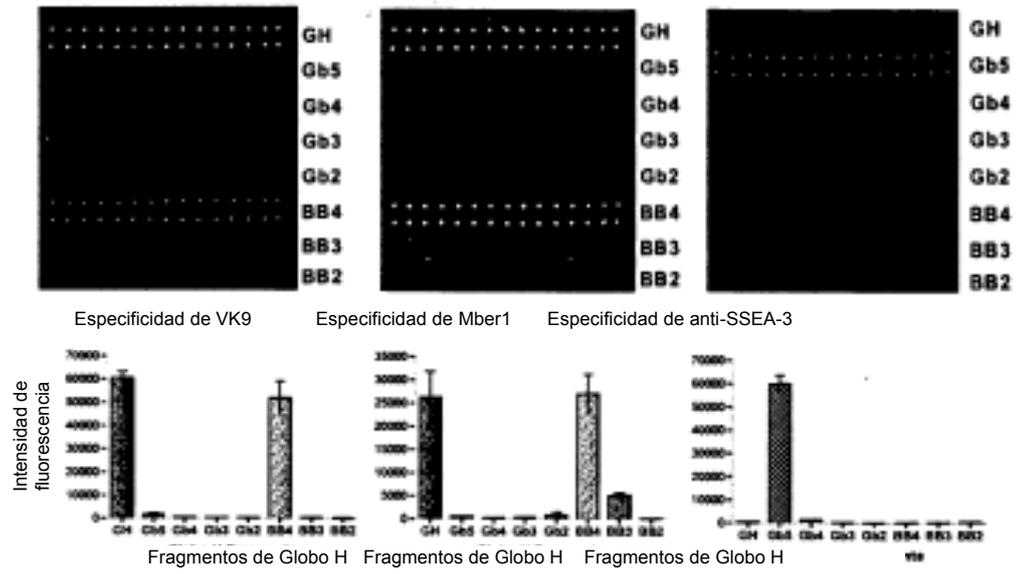


Figura 3A

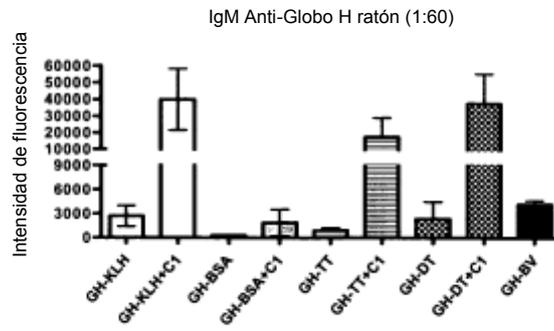
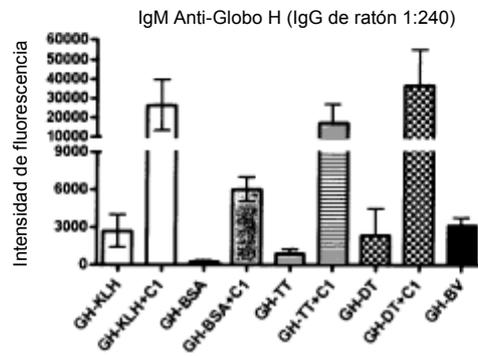


Figura 3B



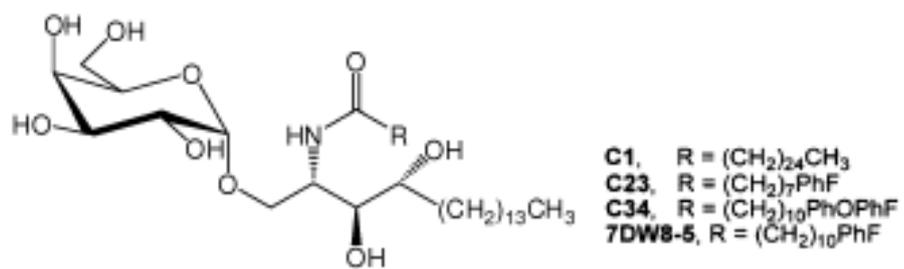


Figura 4

Figura 5

2º IgM Anti-Globo H de ratón 1:60 3º IgM Anti-Globo H de ratón 1:60

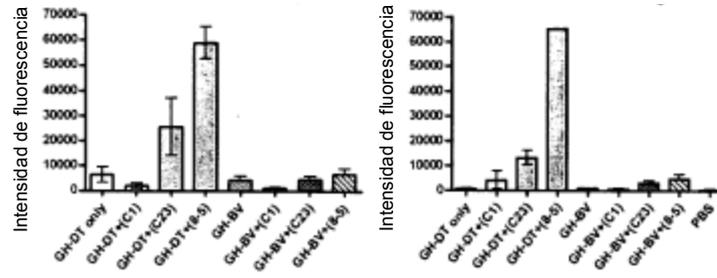


Figura 6

IgG Anti-Globo H de ratón

IgG Anti-Gb5 de ratón

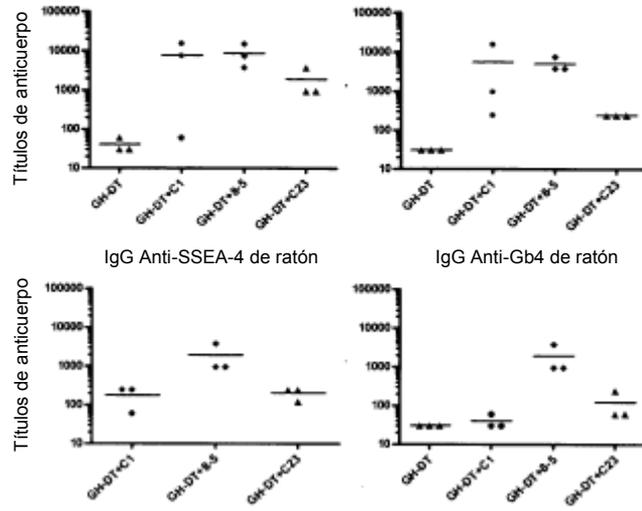


Figura 7

Título de IgM Anti-Globo H

Título de IgG Anti-Globo H

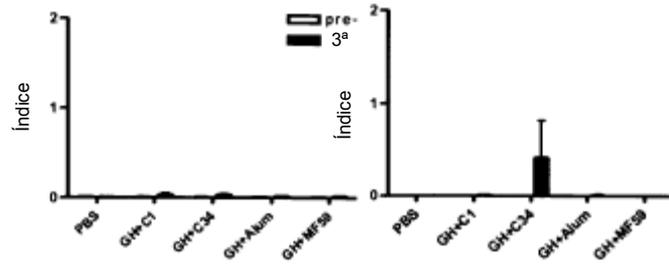


Figura 8

IgG Anti-Globo H de ratón GH 1:60

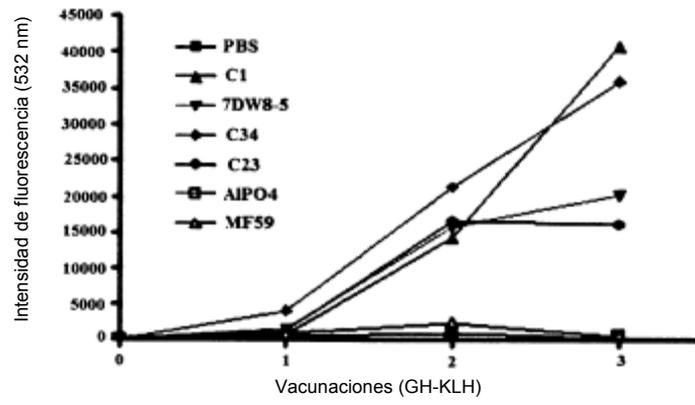


Figura 9

Respuesta de anticuerpo anti-globo H

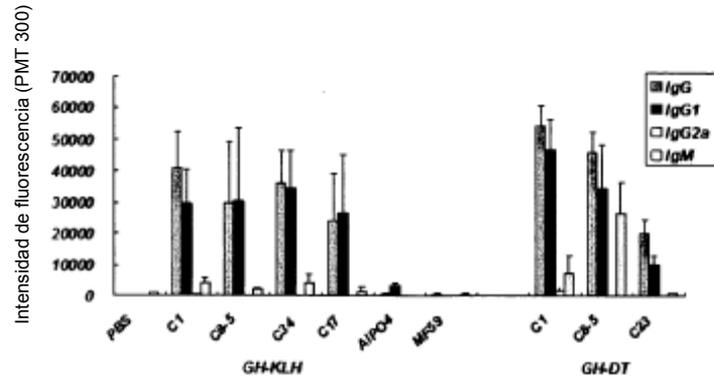


Figura 10

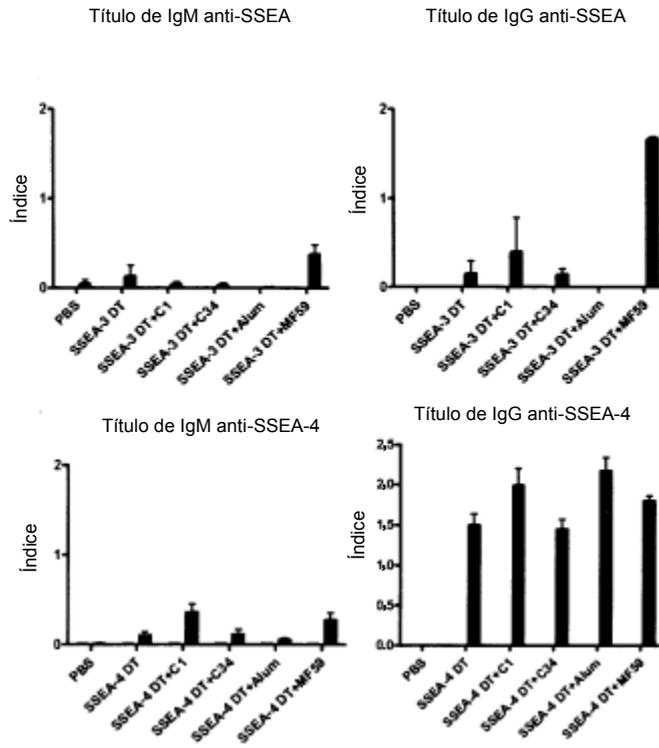


Figura 12(A)

Adyuvante Globo H-DT/ IgG anti-Globo

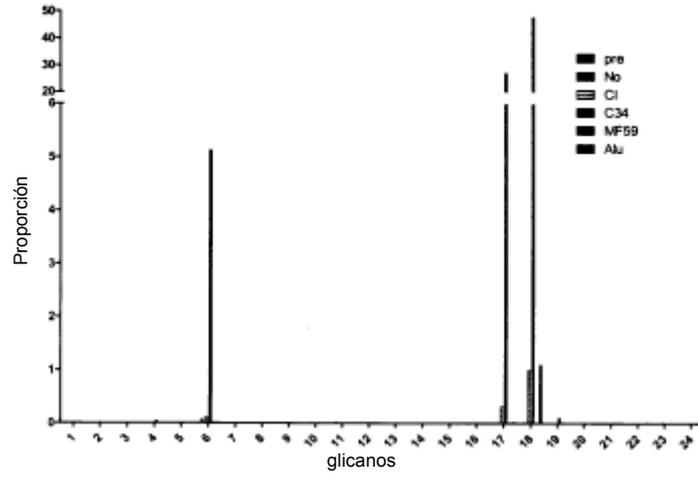


Figura 12(B)

Adyuvante Gb5-DT/IgG anti-Gb5 de C1

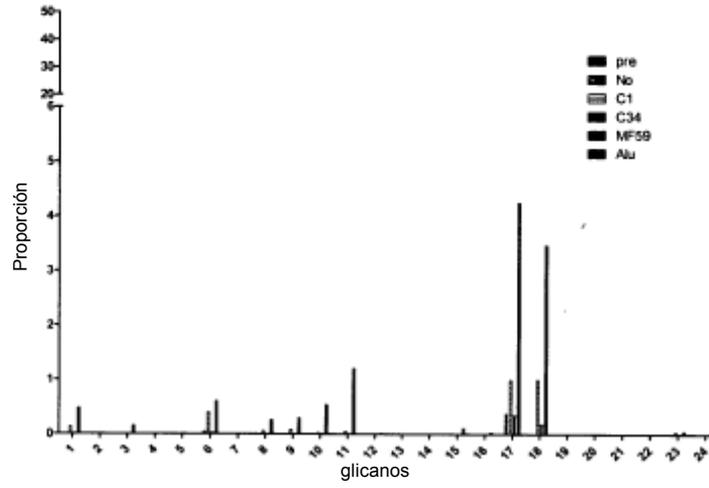


Figura 12(C)

Adyuvante SSEA-4-DT/IgG anti-SSEA-4 de C1

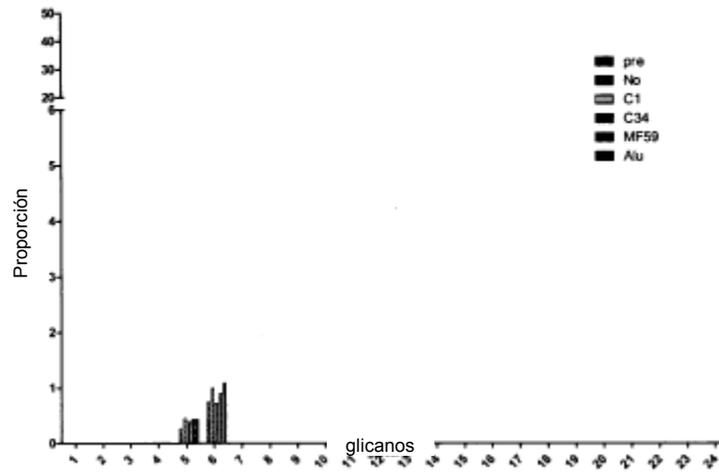
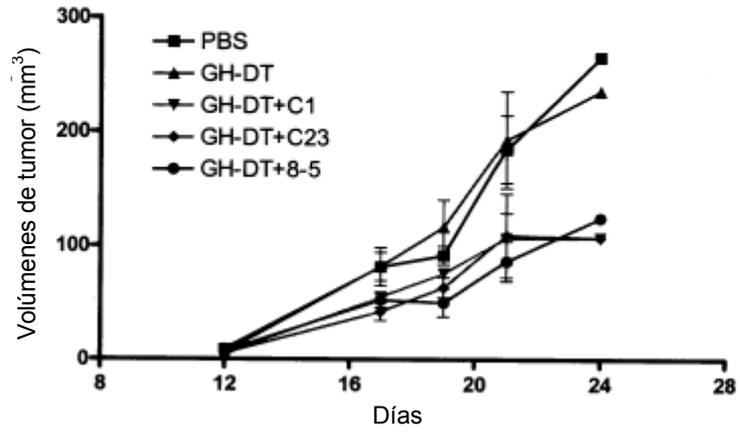


Figura 13

Modelo de xenoinjerto de GH4 (4T1)



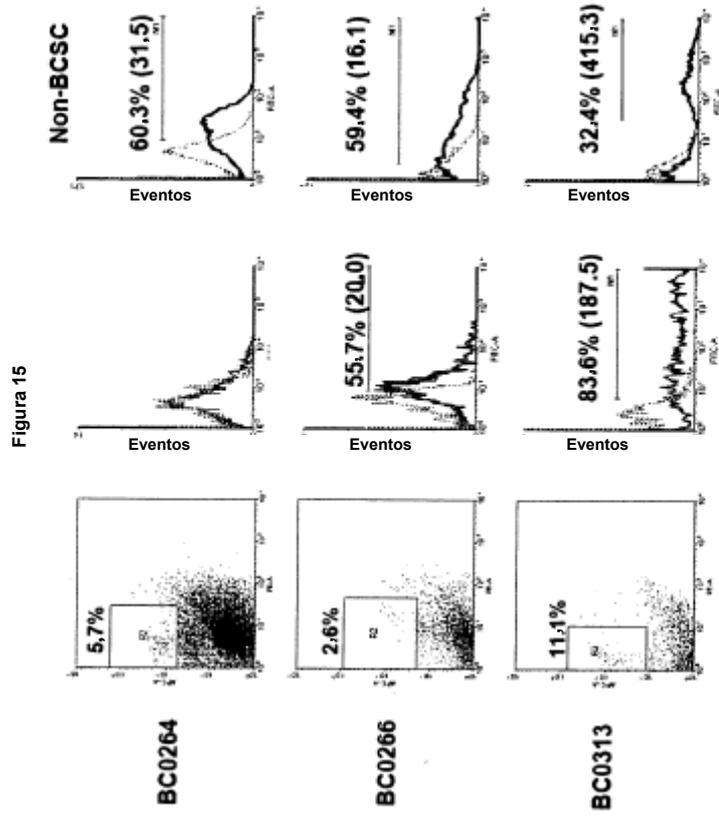


Figura 16

