

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 050**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2014 PCT/GB2014/051421**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2014 WO2014181121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2014 E 14723864 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2994148**

54 Título: **Terapia del cáncer**

30 Prioridad:
09.05.2013 GB 201308325

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2017

73 Titular/es:
IMMODULON THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
475 Salisbury House
London Wall London EC2M 5QQ, GB

72 Inventor/es:
HAGEMANN, THORSTEN

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 618 050 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia del cáncer

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de la terapia del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a un método de prevención, tratamiento o inhibición del desarrollo de tumores o metástasis en un sujeto y a un inmunomodulador para el uso en tal terapia, en combinación con un inhibidor de mTOR.

Antecedentes de la invención

10 En los últimos años se viene observando que las respuestas inmunes desempeñan un papel central en la biología del cáncer eliminando muchos tumores en un estadio muy temprano y manteniendo en un estado de equilibrio aquellos que se resisten a la eliminación total, a veces durante muchos años (Dunn et al, Annu Rev Immunol 2004; 22:329-360). La salida final de esta fase de equilibrio con manifestación clínica de la enfermedad se asocia con respuestas inmunes alteradas, que se manifiestan, por ejemplo, como inflamación crónica o inmunosupresión. La fuerte y creciente evidencia de que el sistema inmunitario está implicado críticamente en el desarrollo, la naturaleza

15 estructural y la progresión del cáncer ha llevado a un renovado interés en estrategias inmunoterapéuticas para el tratamiento de esta clase de enfermedades. Hasta la fecha, la mayoría de los intentos de desarrollar tales estrategias se han basado en el uso de antígenos obtenidos a partir del propio tumor del paciente o de líneas celulares tumorales y la transferencia de poblaciones expandidas *ex vivo* de células citotóxicas específicas de antígeno tumoral y células presentadoras de antígeno.

20 El cáncer se ha asociado con la inflamación desde 1863, cuando Rudolf Virchow descubrió leucocitos en tejidos neoplásicos y así hizo la primera conexión entre inflamación y cáncer (Balkwill et al, Lancet 2001; 357:539-545). Desde entonces, se ha considerado que la inflamación crónica es un factor de riesgo para el cáncer. Estos informes demuestran que un ambiente inflamatorio predispone al desarrollo del tumor y es consecuente con lo observado en los sitios del tumor. Sin embargo, la relación del cáncer con la inflamación no se limita al inicio de la enfermedad

25 debido a inflamación crónica. Schwartsburd (Cancer Met Rev 2003; 22:95-102) propuso que la inflamación crónica se produce debido al estrés en el ambiente del tumor y que esto genera un escudo contra el sistema inmunitario. Se ha demostrado recientemente que el microambiente tumoral se asemeja a un sitio de inflamación, con soporte significativo para la progresión del tumor, a través de quimiocinas, citocinas, linfocitos y macrófagos que contribuyen tanto a neovascularización como a dilatación vascular para aumentar el flujo sanguíneo, a inmunosupresión

30 asociada con la enfermedad maligna y a metástasis tumoral. Además, este microambiente generado por el tumor en el sitio de la inflamación, aparte de su importante función como escudo protector contra el sistema inmunitario y en la promoción de la progresión del cáncer, tiene un efecto adverso sobre el éxito de los tratamientos actuales contra el cáncer.

35 Además, las células cancerosas metastásicas salen del tumor como microcolonias, que contienen linfocitos y plaquetas, así como células tumorales. La inflamación sigue desempeñando una función en los sitios metastásicos creando un entorno de citoquinas propicio para el crecimiento tumoral.

La homeostasis inmunológica consiste en una interacción estrictamente regulada de señales pro-y anti-inflamatorias. Por ejemplo, la pérdida de las señales antiinflamatorias conduce a inflamación crónica y a señalización proliferativa. Curiosamente, en el sitio del tumor se producen citoquinas que tanto promueven como suprimen la proliferación de

40 las células tumorales. Como en el caso de la iniciación del cáncer, es el desequilibrio entre los efectos de estos diversos procesos lo que da como resultado la promoción del tumor.

Se cree que, para tratar el cáncer, el tipo de respuesta inmune más efectiva es de Tipo 1, que favorece la inducción de respuestas celulares Th1 CD4+ y de respuestas CTL CD8+. En el contexto de la inmunoterapia contra el cáncer, se pueden utilizar inmunostimulantes, que promueven el desarrollo de respuestas Th1. Por ejemplo, BCG (Bacilo Calmette-Guerin), una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, desarrollada como vacuna contra la infección por

45 *M. tuberculosis*, es también utilizada para el tratamiento de otras condiciones, tales como carcinoma de vejiga y melanoma cutáneo. La instilación intravesical de BCG para el carcinoma de células transicionales superficiales de la vejiga se considera actualmente un tratamiento de primera línea para esta enfermedad. Aunque las complicaciones graves con BCG intravesical son poco corrientes, éstas pueden ocurrir en individuos y pueden extenderse desde síntomas locales a hepatitis, neumonitis, sepsis, y muerte. SRL-172 es una preparación de *M. vaccae* matadas por calor, un miembro del mismo género que el BCG, pero con propiedades inmunológicas adicionales, ya que induce tanto inmunorregulación de las respuestas Th2 como efectos potenciadores de Tipo 1.

50

Hasta la fecha, una barrera importante para los intentos de desarrollar una inmunoterapia eficaz contra el cáncer ha sido la incapacidad para romper la inmunosupresión en el sitio del cáncer y restaurar los mecanismos normales de reactividad inmunitaria. El enfoque fisiológico de la inmunoterapia es normalizar la reactividad inmunitaria de modo

55 que se reconocieran los antígenos tumorales endógenos y se desarrollarían respuestas citolíticas eficaces contra las células que llevan estos antígenos.

Las respuestas inmunes contra el cáncer que acompañan la acción de la quimioterapia y la radioterapia se han revisado con detalle y muestran que tales respuestas son críticas para el éxito terapéutico eliminando células cancerosas residuales y manteniendo micrometástasis en estado de latencia Zitvogel et al, J Clin Invest 2008;118:1991-2001) . Sin embargo, esta referencia deja claro que no hay una estrategia inmunoterapéutica simple disponible para potenciar consistentemente tales respuestas inmunes.

Se han hecho esfuerzos en la técnica para proporcionar terapia ablativa combinada con quimioterapias para el tratamiento de tumores. Los documentos WO2000064476 y US20050187207 describen el uso de un inmunoadyuvante en combinación con terapia fotodinámica para el tratamiento de tumores metastásicos. Estos documentos describen que el inmunoadyuvante comprende esqueletos de pared celular micobacterianos y lípido A 3-O-desacilado y se administra por inyección en el tumor. Castano et al (Nat Rev Cancers 2006; 6:535), Korbelik et al (J Photochem Photobiol 1998; 44:151) and Korbelik et al (J Photochem Photobiol 2001; 73:403) también describen el tratamiento de tumores usando una combinación de terapia fotodinámica y la administración de extracto de pared celular micobacteriana como un inmunoadyuvante. Las paredes celulares de micobacterias contienen compuestos tales como dimicolato de trehalosa y muramil dipéptido que son inmunoestimuladores conocidos. Los extractos de paredes celulares de micobacterias utilizados en las terapias combinadas de la técnica anterior también suscitan citoquinas proinflamatorias, especies de nitrógeno reactivo y reclutan leucocitos que están asociados con patologías, que incluyen pérdida de peso debido a la caquexia mediada por TNF- α , con lipemia asociada, hipoglucemia y peritonitis con isquemia y lesiones hemorrágicas en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, las terapias combinadas de la técnica anterior pueden exacerbar la respuesta inflamatoria y tener efectos secundarios graves.

El documento EP2085466 describe el concepto de administrar microorganismos vivos atenuados junto con un fármaco para cáncer, p.ej. rapamicina. Los microorganismos atenuados deben conservar la capacidad de infectar macrófagos, con el fin de inducir la apoptosis en los macrófagos.

El documento WO2006/109300 describe el uso de componentes micobacterianos para tratar células del donante antes o después del aislamiento de las células del donante para la readministración a un paciente. La intención es tratar las células del donante para disminuir el efecto de la enfermedad injerto contra huésped.

Un objetivo de la presente invención es resolver los problemas asociados con las terapias de combinación para tumores observados en la técnica anterior y, específicamente, proporcionar un tratamiento para cánceres secundarios formados por metástasis de un cáncer primario lejos del sitio del cáncer primario.

30 Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método eficaz para tratar y/o prevenir el cáncer empleando un inhibidor de mTOR que actúa sinérgicamente con un *Mycobacterium* de célula entera. Por lo tanto, la presente invención proporciona una terapia de combinación de un inhibidor de mTOR con un tipo específico de inmunoterapia. Los inventores han encontrado que la combinación de ambas terapias es sinérgica más allá de los efectos aditivos simples de cada terapia utilizada individualmente.

En un primer aspecto de la invención, hay un *Mycobacterium* de célula entera para utilizar en el tratamiento de una enfermedad neoplásica en combinación con un inhibidor de mTOR, en donde el *Mycobacterium* es un *Mycobacterium* no patógeno matado por calor.

En un segundo aspecto de la invención hay un método para prevenir, tratar, reducir, inhibir y/o controlar una neoplasia, tumor o cáncer primario, en un sujeto, en donde dicho método comprende administrar al sujeto simultáneamente, por separado o secuencialmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) un inhibidor de mTOR, y (ii) un *Mycobacterium* de célula entera.

En un tercer aspecto de la invención hay un método para prevenir, tratar, reducir, inhibir y/o controlar la formación o establecimiento de metástasis de una neoplasia, tumor o cáncer primario en uno o más sitios distintos de una neoplasia, tumor o cáncer primario, en donde dicho método comprende administrar al sujeto simultáneamente, por separado o secuencialmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) un inhibidor de mTOR, y (ii) un *Mycobacterium* de célula entera, en donde el *Mycobacterium* es un *Mycobacterium* no patógeno matado por calor.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una terapia de combinación de un inhibidor de mTOR junto con un tipo específico de inmunoterapia. Los inventores han encontrado que la combinación de ambas terapias es sinérgica más allá de los efectos aditivos simples de cada terapia utilizada individualmente.

Descripción de los dibujos

La invención se describe con referencia al siguiente dibujo, en el que:

La figura 1 muestra el efecto de IMM-101 con o sin coadministración de rapamicina, sobre la supervivencia en un modelo de cáncer pancreático espontáneo en ratones (ratones KC) después de la inyección ortotópica de células KPC.

Descripción detallada de la invención

Los términos "tumor", "cáncer", "neoplasia" y "enfermedad neoplásica" se utilizan indistintamente y se refieren a una célula o población de células cuyo crecimiento, proliferación o supervivencia es mayor que el crecimiento, proliferación o supervivencia de una célula homóloga normal, p.ej. un trastorno diferenciador o proliferativo celular. Típicamente, el crecimiento es incontrolado. El término "malignidad" se refiere a invasión de tejido cercano. El término "metástasis" se refiere a la propagación o diseminación de un tumor, cáncer o neoplasia a otros sitios, lugares o regiones dentro del sujeto, en los que los sitios, localizaciones o regiones son distintos del tumor primario o cáncer.

El término "mTOR" se refiere a la serina-treonina quinasa conocida como Diana de Rapamicina en Células de Mamífero, por sus siglas en inglés. En la actualidad existen dos formas reconocidas de señalización multi-molecular de mTOR, complejo 1 de mTOR (mTORC1) y complejo 2 de mTOR (mTORC2).

El término inhibidor tiene su significado convencional tal como se utiliza en la técnica, es decir, una entidad que es capaz de unirse a una enzima y disminuir la actividad de la misma. Preferiblemente, el inhibidor de mTOR es capaz de unirse al mismo, y prevenir o prevenir sustancialmente la formación de mTORC1 a partir de sus componentes constituyentes, con el fin de suscitar una reducción en la actividad de mTORC1; el inhibidor de mTOR también puede ser capaz de unirse a mTORC2 con los mismos efectos. Más preferiblemente, se selecciona el inhibidor de mTOR de: sirolimus, everolimus, ridaforolimus, temsirolimus o metformina, o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, clatrato, profármaco, análogo o variante derivada de los mismos farmacéuticamente aceptable y/o combinaciones de los mismos. Lo más preferiblemente, el inhibidor de mTOR es sirolimus, o un derivado del mismo como se ha enumerado anteriormente.

Como se utiliza en la presente invención, los términos "paciente" y/o "sujeto" se pueden utilizar indistintamente.

La administración "simultánea", como se define en la presente invención, incluye la administración de *Mycobacterium* y del inhibidor de mTOR con una diferencia de aproximadamente 2 horas o aproximadamente 1 hora o menos entre sí, incluso más preferiblemente al mismo tiempo.

La administración "separada", como se define en la presente invención, incluye la administración de *Mycobacterium* y del inhibidor de mTOR, con una diferencia de más de aproximadamente 12 horas, o aproximadamente 8 horas, o aproximadamente 6 horas o aproximadamente 4 horas o aproximadamente 2 horas de diferencia.

La administración "secuencial", como se define en la presente invención, incluye la administración del *Mycobacterium* y del inhibidor de mTOR cada uno en múltiples alcuotas y/o dosis y/o en ocasiones separadas. Opcionalmente, se administra antes el *Mycobacterium* y se sigue administrando al sujeto después de la administración del inhibidor de mTOR. Alternativamente, se continúa aplicando el *Mycobacterium* al sujeto después del tratamiento para la regresión del tumor.

La vía de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) es un regulador crucial del crecimiento y la proliferación celular y la investigación en este área ha revelado que la alteración de mTOR tiene una función clave que desempeñar en varios tipos de cáncer. mTOR parece desempeñar una función central en la señalización causada por nutrientes y mitógenos tales como factores de crecimiento para regular la traducción. El conocimiento de la ciencia detrás del papel de mTOR como regulador de muchos procesos celulares y su potencial como diana terapéutica ha abierto posibilidades de tratamiento en varios tipos de cáncer. mTOR es una serina-treonina quinasa de 290 KDa que regula tanto el crecimiento celular como la progresión del ciclo celular a través de su capacidad para integrar las señales de los estímulos de los nutrientes y del factor de crecimiento. mTOR, un miembro de la superfamilia de las quinasas (PIKK) relacionada con fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), está compuesta por 2549 aminoácidos que se agrupan en dominios altamente conservados. El mTOR es una quinasa intracelular que controla la producción de proteínas a través de efectos en la maquinaria de traducción de mRNA. Estas proteínas incluyen componentes importantes de varios procesos críticos para el metabolismo celular, crecimiento celular, división celular y respuestas a estrés celular tales como hipoxia o daño del ADN.

mTOR detecta las condiciones de crecimiento dentro del ambiente celular y ayuda a las células a responder a los cambios en este entorno. Un mTOR activo coordina una respuesta en el crecimiento celular directamente a través de sus efectos sobre los reguladores del ciclo celular e indirectamente manteniendo el suministro de nutrientes en la célula a través de la producción de transportadores de nutrientes y en el ambiente de la célula a través de la promoción de la angiogénesis. La activación de mTOR significa un punto de decisión que tiene en cuenta la disponibilidad de los materiales básicos necesarios para el crecimiento celular (p. ej., aminoácidos, glucosa, energía) y las señales reguladoras del crecimiento de otras células y tejidos (p. ej., hormonas, factores de crecimiento) mientras se monitorizan las condiciones de estrés celular (p. ej., hipoxia, daño del ADN, choque térmico, pH externo, estrés osmótico, estrés oxidativo). De esta manera, la célula está protegida de señales fuera de la célula para crecer y proliferar que se originan cuando el suministro de nutrientes y energía dentro de la célula no son suficientes para soportar el esfuerzo.

Aguas arriba en las vías promotoras del crecimiento hay moléculas críticas que convergen en mTOR, que a menudo están alteradas de alguna manera en el cáncer. Varias mutaciones encontradas en el cáncer producen señales inapropiadas que activan el interruptor de mTOR, impulsando el crecimiento y la proliferación de la célula cancerosa.

5 mTOR detecta la disponibilidad de nutrientes (p. ej., trifosfato de adenosina (ATP), glucosa, aminoácidos, colesterol y hierro) y consolida esta información con la señalización del factor de crecimiento a través de la vía PI3K/Akt/complejo de esclerosis tuberosa (TSC). Un mTOR activado modula la velocidad de síntesis de proteínas para ARNm selectos mediante fosforilación de la proteína de traducción S6 quinasa (S6K) y de la proteína 1 de unión a 4E (4E-BP1). La activación de mTOR aumenta los efectores aguas abajo que estimulan el crecimiento

10 celular y la angiogénesis y regulan el metabolismo celular.

Una forma primaria en la que mTOR ejerce sus efectos regulatorios sobre la proliferación celular es controlando la producción de ciclina D1. Las ciclinas son proteínas que regulan la actividad de enzimas llamadas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) a través del punto de restricción crítico G1-S del ciclo celular, que a su vez regulan el paso de las células. Recientemente, la ciclina D1 se ha demostrado que desempeña un papel en la transcripción de genes, el metabolismo celular y la migración celular.

15

La sobreexpresión de ciclina D1 ha sido asociada con un número de cánceres que incluyen cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, linfoma, y melanoma.

Las mutaciones en el complejo de esclerosis tumoral (TSC1 o TSC2) también pueden conducir a la sobreactivación de mTOR. Esta sobreactivación provoca proliferación celular alterada y tumores multisistémicos en pacientes con TSC. Se ha observado una mayor activación de mTOR, como se evidencia por hiperfosforilación de proteínas de señalización aguas abajo, en lesiones relacionadas con TSC.

20

mTOR desempeña una función clave en la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos para proporcionar oxígeno y nutrientes a las células en crecimiento y división. mTOR aumenta la traducción del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1)/factor inducible por hipoxia 2 (HIF-2). Los factores de transcripción HIF impulsan la expresión de los genes de respuesta al estrés hipóxico, que incluyen el factor de crecimiento angiogénico, tal como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas β (PDGF- β) y el factor de crecimiento transformante α (TGF- α).

25

Se ha demostrado que los niveles incrementados de HIF-1 α y HIF-1 β se correlacionan con el aumento de la mortalidad en varios tipos de tumores, que incluyen cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, carcinoma pulmonar no microcítico, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello y tumores del estroma gastrointestinal. Además, la pérdida de la proteína Von Hippel-Lindau (VHL), que también da como resultado un aumento de los niveles de HIF-1 α , es una causa primaria de muchos casos de carcinoma de células renales (RCC), y también ha estado implicada en el cáncer de páncreas y en tumores neuroendocrinos (NETs).

30

La investigación bioenergética ha demostrado que mTOR juega un papel clave en la regulación del metabolismo celular. mTOR aumenta la expresión superficial de las proteínas transportadoras de nutrientes. Un aumento en estas proteínas da como resultado una mayor absorción de aminoácidos y otros nutrientes por la célula, dando lugar a un adecuado soporte de nutrientes para el crecimiento celular anormal y la supervivencia. Además, el mTOR activado de forma anormal puede dar a las células cancerosas una ventaja de crecimiento competitivo incrementando la producción de las enzimas nucleares necesarias para la glucólisis, lo que permite a las células cancerosas sobrevivir y crecer incluso bajo condiciones de hipoxia.

35

Hay varias líneas de evidencia de que la actividad de mTOR desempeña una función en la supervivencia celular. La mayor parte de esta investigación ha revelado que la inhibición de mTOR aumenta la sensibilidad a las vías de muerte celular; sin embargo, hay también evidencia emergente de que la activación de mTOR puede desempeñar una función promoviendo la supervivencia celular a través de la activación de proteínas antiapoptóticas que contribuyen a la progresión del tumor.

45

La sobreactivación de mTOR debido a la alteración de vías aguas arriba, que conduce a actividades anormales en la progresión celular, la angiogénesis, el metabolismo celular y la apoptosis, ha estado implicada en diversos tipos de cáncer.

Carcinoma de células renales

50 mTOR controla la producción de HIF-1 α , una proteína importante en carcinoma de células renales (RCC), donde su actividad alterada está causalmente relacionada con la patogénesis de la enfermedad. mTOR regula la producción de varios factores de crecimiento angiogénicos en RCC. mTOR puede controlar la capacidad de las células neovasculares para responder a factores de crecimiento. mTOR controla el crecimiento celular y la división celular en RCC y en células de la microvasculatura tumoral, y a menudo se altera en el cáncer renal por defectos de señalización aguas arriba de mTOR en la vía PI3K/Akt/mTOR. mTOR regula la absorción de nutrientes y el metabolismo celular y contribuye a los cambios metabólicos característicos en RCC.

55

Tumor neuroendocrino (NET)

Varios cambios moleculares importantes en NETs implican la vía mTOR. Se ha observado frecuentemente en NETs una mayor señalización de factores de crecimiento, específicamente, señalización el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) aguas arriba de mTOR. Además, se cree que la secreción de insulina está implicada en la activación autócrina de mTOR en tumores de células beta pancreáticas. mTOR se activa por muchas mutaciones génicas asociadas con NETs (deleción de la línea germinal del gen VHL). mTOR dirige el suministro de nutrientes a las células cancerosas mediante la regulación de la angiogénesis. Los NETs son muy vasculares. La expresión de VEGF se ha observado en el 80-86% de los tumores carcinoides gastrointestinales y de las células de los islotes pancreáticos.

10 Cáncer gástrico

El mTOR se activa en 60-80% de adenocarcinomas gástricos y se expresa en estadios tempranos y avanzados de la enfermedad, tanto en los subtipos difusos como intestinales, y en las células tumorales que invaden los canales linfáticos. La vía de mTOR es activada por receptores de múltiples factores de crecimiento, específicamente, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1R), que se sobreexpresan en muchos tumores gástricos. mTOR regula la producción de factores angiogénicos (VEGF/VEGFR) que promueven la formación de nuevos vasos y predicen un mal resultado en pacientes con cáncer gástrico. mTOR regula la absorción de nutrientes y el metabolismo celular y contribuye a los cambios metabólicos característicos en el cáncer. El HIF-1 α se expresa en la mayoría de los cánceres gástricos, y la expresión de HIF-1 α en el borde del tumor invasor se asocia con enfermedad en estadio avanzado, metástasis ganglionares y mala supervivencia.

Cáncer de mama

La señalización de mTOR es fundamental en la patogénesis del cáncer de mama. La señalización de mTOR puede estar relacionada con la activación del receptor de estrógenos (ER) y la hipersensibilidad de estrógenos adaptativa. La señalización de la vía de mTOR se aumenta en células tumorales HER2+ resistentes a la terapia endocrina. La activación de mTOR predice un peor resultado clínico para los pacientes tratados con terapia endocrina. mTOR controla el suministro de nutrientes a las células cancerosas regulando la absorción de nutrientes, el metabolismo celular y la angiogénesis.

Carcinoma hepatocelular (HCC)

La señalización dependiente de mTOR es activa en 25-45% de HCC. La activación se correlaciona con una supervivencia global más corta; la activación de mTOR es un predictor independiente de recurrencia después de la cirugía. mTOR regula la producción de factores angiogénicos. Los altos niveles de VEGF se han asociado con la proliferación de células tumorales, la mala encapsulación de los nódulos tumorales, la invasión venosa, el grado más alto, y un mal pronóstico después de la resección. La activación de mTOR a través de la vía PI3K/Akt se asocia con aumento de la expresión de factores de crecimiento como el EGF, TGF- α , IGF, y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que promueven la proliferación y la supervivencia de células HCC.

Linfoma

Aproximadamente 85% de linfoma no Hodgkin (LNH) proviene de células del linaje de células B. La señalización de mTOR se activa en líneas celulares de linfoma de Hodgkin y en tumores primarios. La sobreexpresión de ciclina D1 es un rasgo característico de los linfomas de células del manto. La sobreexpresión de PI3K y Akt se observa con frecuencia en varios linfomas de células B.

En un aspecto de la presente invención, el *Mycobacterium* de célula entera es matado por calor. Ejemplos de especies micobacterianas para uso en la presente invención incluyen *M. vaccae*, *M. thermoresistibile*, *M. flavescens*, *M. duvalii*, *M. phlei*, *M. obuense*, *M. parafortuitum*, *M. sphagni*, *M. aichiense*, *M. rhodesiae*, *M. neoaurum*, *M. chubuense*, *M. tokaiense*, *M. komossense*, *M. aurum*, *M. indicus pranii*, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum*; *M. kansasii*, *M. marinum*; *M. simiae*; *M. gastri*; *M. nonchromogenicum*; *M. terrae*; *M. trivale*; *M. gordonae*; *M. scrofulaceum*; *M. paraffinicum*; *M. intracellulare*; *M. avium*; *M. xenopi*; *M. ulcerans*; *M. diernhoferi*, *M. smegmatis*; *M. thamnopheos*; *M. flavescens*; *M. fortuitum*; *M. peregrinum*; *M. chelonae*; *M. paratuberculosis*; *M. leprae*; *M. lepraemurium* y combinaciones de las mismas.

El *Mycobacterium* matado por calor no es patógeno. El *Mycobacterium* matado por calor no patógeno es preferiblemente seleccionado de *M. vaccae*, *M. obuense*, *M. parafortuitum*, *M. aurum*, *M. indicus pranii*, *M. phlei* y combinaciones de los mismos. Más preferiblemente el *Mycobacterium* matado por calor no patógeno es una variante rugosa. La cantidad de *Mycobacterium* administrada al sujeto es suficiente para suscitar una respuesta inmune protectora en el sujeto de tal manera que el sistema inmunitario del sujeto es capaz de aumentar una respuesta inmune eficaz contra el cáncer. En ciertas realizaciones de la invención, es preferible que se administre una dosis particular de *Mycobacterium* y/o un esquema de dosificación a un sujeto. Así, en ciertas realizaciones de la invención, se proporciona un medio de contención que comprende la cantidad eficaz de *Mycobacterium* matado por calor para uso en la presente invención, que típicamente puede ser de 10^3 a 10^{11} organismos, preferiblemente de 10^4 a 10^{10} organismos, más preferiblemente de 10^6 a 10^{10} organismos, e incluso más preferiblemente de 10^6 a 10^9

- organismos. La cantidad eficaz de *Mycobacterium* matado por calor para uso en la presente invención puede ser de 10^3 a 10^{11} organismos, preferiblemente de 10^4 a 10^{10} organismos, más preferiblemente de 10^6 a 10^{10} organismos, e incluso más preferiblemente de 10^6 a 10^9 organismos. Lo más preferiblemente, la cantidad de *Mycobacterium* matado por calor para su uso en la presente invención es de 10^7 a 10^9 células u organismos. Típicamente, la composición según la presente invención se puede administrar a una dosis de 10^8 a 10^9 células para uso humano y animal. Alternativamente, la dosis está entre aproximadamente 0,01 mg a 1 mg o entre aproximadamente 0,1 mg a 1 mg en peso de organismos, presentada o bien como una suspensión o como una preparación seca. *M.vaccae* y *M. obuense* son particularmente preferidas.
- M. vaccae* y *M. obuense* inducen una respuesta inmunitaria compleja en el huésped. El tratamiento con estas preparaciones estimulará la inmunidad innata y de tipo 1 (Th1), que incluye la activación de los macrófagos y la actividad de las células citotóxicas. También regulan el descenso de forma independiente de las respuestas de Th2 inapropiadas a través de mecanismos inmunorreguladores. Esto restaura el equilibrio saludable del sistema inmunitario.
- La presente invención se puede utilizar para tratar una enfermedad neoplásica. Como se utiliza en la presente invención, "tratamiento" abarca prevención, reducción, control y/o inhibición de una enfermedad neoplásica. Tales enfermedades incluyen un sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma o leucemia. Los cánceres ilustrativos incluyen carcinoma, sarcoma, adenocarcinoma, melanoma, neural (blastoma, glioma), mesotelioma y trastornos neoplásicos reticuloendoteliales, linfáticos o hematopoyéticos (por ejemplo, mieloma, linfoma o leucemia). En aspectos particulares, una neoplasia, tumor o cáncer incluye un adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón, carcinoma gástrico difuso o intersticial, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de esófago, carcinoma de mama, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma de la glándula suprarrenal, adenocarcinoma uterino o del endometrio.
- Las neoplasias, tumores y cánceres incluyen tipos benignos, malignos, metastásicos y no metastásicos, e incluyen cualquier estadio (I, II, III, IV o V) o grado (G1, G2, G3, etc.) de neoplasia, tumor o cáncer o una neoplasia, tumor, cáncer o metástasis que está progresando, empeorando, estabilizado o en remisión. Los cánceres que se pueden tratar según la invención incluyen, pero no se limitan a, células o neoplasmas de la vejiga, sangre, hueso, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, gastrointestinos, encía, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero. Además, el cáncer puede ser específicamente del siguiente tipo histológico, aunque no se limita a lo siguiente: neoplasia maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma de pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células transicionales; adenocarcinoma; gastrinoma maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular combinado con colangiocarcinoma; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis cólica familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma bronquioloalveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromóforo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxifílico; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma de endometrio; carcinoma del apéndice de la piel; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma cerámico; carcinoma mucoepidermoide; cistoadenocarcinoma; cistoadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistoadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sello; carcinoma ductal infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobular; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor estromal ovárico, maligno; tecoma maligno; tumor de la célula granulosa, maligno; androblastoma maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extra mamario, maligno; feocromocitoma; sarcoma del tejido blando; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma maligno en el nevus pigmentado gigante; melanoma de células epitelioides; nevus azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiomasarcoma; rabdomyosarcoma; rabdomyosarcoma embrionario; rabdomyosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto; tumor mulleriano mixto; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoide maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma, maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma, maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefoma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma juxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma maligno; condrosarcoma mesenquimal; tumor de hueso de células gigantes; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplasmático; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfativo; meningioma, maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; paragranuloma de Hodgkin; linfoma maligno linfocítico de células pequeñas; linfoma maligno difuso de células grandes; linfoma maligno, folicular; micosis fungoide; otros linfomas no Hodgkin especificados; histiocitosis maligna; mieloma múltiple; sarcoma de

5 mastocitos; enfermedad inmunoproliferativa del intestino delgado; leucemia; leucemia linfoide; leucemia de células plasmáticas; eritroleucemia; leucemia de células del linfosarcoma; leucemia mieloide; leucemia basofílica; leucemia eosinofílica; leucemia monocítica; leucemia de mastocitos; leucemia megacarioblástica; sarcoma mieloide; y leucemia de células pilosas. Preferiblemente, la enfermedad neoplásica pueden ser tumores asociados con un

10 Más preferiblemente, la enfermedad neoplásica a tratar es cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de piel. Lo más preferiblemente, la enfermedad neoplásica a tratar es el cáncer de páncreas.

15 En una realización de la invención, el inhibidor de mTOR, en terapia de combinación con un *Mycobacterium*, se usa para reducir o inhibir la metástasis de un tumor primario o cáncer a otros sitios, o la formación o establecimiento de tumores metastásicos o cánceres en otros sitios distales del tumor primario o cáncer, inhibiendo o reduciendo así la recaída de tumores o cáncer o la progresión de tumores o cáncer.

20 En otras realizaciones, los métodos de la invención incluyen, entre otras cosas, 1) reducir o inhibir el crecimiento, proliferación, movilidad o invasividad de células tumorales o de cáncer que potencialmente desarrollan metástasis, 2) reducir o inhibir la formación o el establecimiento de metástasis que surgen de un tumor o cáncer primario a uno o más sitios, lugares o regiones distintos del tumor primario o cáncer; 3) reducir o inhibir el crecimiento o la proliferación de una metástasis en uno o más sitios, lugares o regiones distintos del tumor primario o cáncer después de que se ha formado o se ha establecido una metástasis, y 4) reducir o inhibir la formación o establecimiento de metástasis adicional después de que se ha formado o establecido la metástasis.

25 En una realización de la invención, la administración del inhibidor de mTOR en terapia de combinación con un *Mycobacterium*, proporciona una mejora detectable o mensurable en un estado de un sujeto dado, tal como aliviar o mejorar uno o más síntomas o consecuencias adversos (físicos) asociados con la presencia de un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis, es decir, un beneficio terapéutico o un efecto beneficioso.

30 Un beneficio terapéutico o efecto beneficioso es cualquier mejora objetiva o subjetiva, transitoria, temporal o de largo plazo en la condición o patología, o una reducción en el inicio, gravedad, duración o frecuencia de un síntoma adverso asociado o causado por la proliferación celular o por un trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Un objetivo clínico satisfactorio de un método de tratamiento de acuerdo con la invención se consigue, por ejemplo, cuando hay una reducción incremental o parcial de la gravedad, duración o frecuencia de una o más patologías asociadas, síntomas adversos o complicaciones, o inhibición o inversión de una o más de las manifestaciones fisiológicas, bioquímicas o celulares o características de proliferación celular o un

35 trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Un beneficio terapéutico o una mejora del mismo puede ser la reducción de síntomas adversos o complicaciones asociadas, o causadas por, proliferación celular o trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Sin embargo, un beneficio terapéutico o mejora no necesita ser una cura o destrucción completa de todas las células proliferantes diana (por ejemplo, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis). Por ejemplo, la estabilización del tumor o la masa del cáncer, el tamaño o el número de células mediante la inhibición de la progresión o el empeoramiento del tumor o el cáncer, pueden reducir la mortalidad y prolongar la esperanza de vida aunque sólo sea durante unos días, semanas o meses, incluso aunque una porción o la mayor parte del tumor o masa del cáncer, tamaño o células permanecen.

45 Ejemplos específicos no limitativos de beneficio terapéutico incluyen una reducción de la neoplasia, tumor o cáncer, o volumen de metástasis (tamaño o masa celular) o número de células, que inhiben o previenen un aumento de neoplasia, tumor o volumen de cáncer (por ejemplo, estabilización), que retardan o inhiben la neoplasia, tumor o la progresión del tumor o del cáncer, el empeoramiento o la metástasis, o que inhiben la neoplasia, tumor o proliferación, crecimiento o metástasis de cáncer.

50 Un método de invención puede no tener efecto inmediatamente. Por ejemplo, el tratamiento puede ser seguido por un efecto retardado sobre el volumen del tumor y/o un aumento inicial en la neoplasia, el tumor o el número o la masa de células cancerosas, pero con el tiempo eventualmente se puede producir posteriormente una estabilización o reducción de la masa, tamaño o número de células de células tumorales en un sujeto dado.

55 Los síntomas adversos adicionales y las complicaciones asociadas con neoplasia, tumor, cáncer y metástasis que se pueden inhibir, reducir, disminuir, retrasar o prevenir incluyen, por ejemplo, náuseas, falta de apetito, letargo, dolor e incomodidad. Así, una disminución parcial o total de la gravedad, duración o frecuencia de un síntoma adverso o complicación asociada o causada por un trastorno hiperproliferativo celular, una mejora en el bienestar de los sujetos, como el aumento de la energía, el apetito, el bienestar psicológico, son ejemplos particulares no limitativos de beneficio terapéutico.

Un beneficio o mejora terapéutica, por tanto, también puede incluir una mejora subjetiva en la calidad de vida de un sujeto tratado.

5 En una realización adicional, un método prolonga o extiende la vida útil (supervivencia) del sujeto. En otra realización, un método mejora la calidad de vida del sujeto.

10 Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad suficiente de un agente para proporcionar el resultado biológico, terapéutico y/o profiláctico deseado. Ese resultado puede ser reducción, mejoría, paliación, disminución, retraso y/o alivio de uno o más de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En referencia al cáncer, una cantidad eficaz comprende una cantidad suficiente para hacer que un tumor se contraiga y/o disminuya la velocidad de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento del tumor) o para prevenir o retrasar otra proliferación celular no deseada. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para retardar el desarrollo. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para prevenir o retrasar la recidiva. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones. La cantidad eficaz del fármaco o composición puede: (i) reducir el número de células cancerosas; (ii) reducir el tamaño del tumor; (iii) inhibir, retardar, reducir la velocidad hasta cierto punto y preferiblemente detener la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos; (iv) inhibir (es decir, reducir la velocidad hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; (v) inhibir el crecimiento tumoral; (vi) prevenir o retrasar la aparición y/o recurrencia del tumor; y/o (vii) aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer.

20 En una realización más preferida, la administración del inhibidor de mTOR, en terapia de combinación con un *Mycobacterium*, da como resultado una mejora clínicamente relevante en uno o más marcadores de estado de enfermedad y progresión seleccionados de uno o más de los siguientes: (i) supervivencia global, (ii) supervivencia libre de progresión, (iii) tasa de respuesta global, (iv) reducción de la enfermedad metastásica, (v) niveles circulantes de antígeno asociado al cáncer, cuando sea pertinente, (vi) estado nutricional (peso, apetito, albúmina sérica), o (vii) control del dolor o uso analgésico.

25 El pretratamiento con células de *M.vaccae* y *M. obuense* enteras matadas por calor da lugar a una inmunidad más compleja que incluye no sólo el desarrollo de inmunidad innata y la inmunidad de Tipo 1, sino también la inmunorregulación que restaura más eficazmente las funciones inmunes apropiadas.

El *Mycobacterium* según la invención se administra en combinación con un inhibidor de mTOR.

30 En una realización preferida, el inhibidor de mTOR se puede seleccionar entre sirolimus, everolimus, ridaforolimus, temsirolimus o metformina o una sal, solvato, hidrato, estereoisómero, clatrato o profármaco, análogo o variante derivada farmacéuticamente aceptable de los anteriores, o combinaciones de los mismos.

En una realización más preferida, el inhibidor de mTOR es rapamicina (sirolimus).

35 El término "combinación" tal como se utiliza a lo largo de la invención, pretende abarcar la administración del inhibidor de mTOR simultánea, separada o secuencialmente con la administración de *Mycobacterium*. Por consiguiente, el inhibidor de mTOR y el *Mycobacterium* pueden estar presentes en la misma formulación farmacéutica o separada, y al mismo tiempo o en momentos diferentes.

Así, se puede proporcionar un *Mycobacterium* y el inhibidor de mTOR como medicamentos separados para administración al mismo tiempo o en momentos diferentes.

40 Preferiblemente, se proporciona un *Mycobacterium* y un inhibidor de mTOR como medicamentos separados para administración en diferentes momentos. Cuando se administran por separado y en momentos diferentes, se puede administrar primero el *Mycobacterium* o el inhibidor de mTOR; sin embargo, es preferible administrar el *Mycobacterium* seguido por el inhibidor de mTOR. Además, ambos se pueden administrar el mismo día o en días diferentes, y se pueden administrar usando el mismo horario o en diferentes horarios durante el ciclo de tratamiento.

45 La duración de cada ciclo de inhibidor de mTOR puede estar entre aproximadamente 1 a aproximadamente 3 días o hasta aproximadamente 52 semanas, o más. Se pueden proporcionar ciclos múltiples para cada medicamento según sea necesario. Así, en una realización de la invención, un ciclo de tratamiento consiste en la administración de *Mycobacterium* diaria, semanal, quincenal o mensual simultáneamente con inhibidor de mTOR. Alternativamente, el *Mycobacterium* se administra antes y/o después de la administración del inhibidor mTOR.

50 Los retrasos en la dosis y/o las reducciones de la dosis y los ajustes del horario se realizan según sea necesario dependiendo de la tolerancia individual del paciente a los tratamientos.

55 Se pueden administrar cantidades eficaces de *Mycobacterium* en múltiples dosis (repetidas), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, o veinte o más dosis repetidas, opcionalmente a intervalos de aproximadamente dos días o aproximadamente 2 semanas, o aproximadamente 4 semanas o aproximadamente 8 semanas.

5 En otra realización, el régimen de tratamiento comprende la administración del *Mycobacterium* cada 2 días o hasta cada dos semanas para las primeras 3 dosis seguidas por un descanso de 4 semanas luego cada 2 semanas para las siguientes 3 dosis seguidas cada 4 semanas después, con la administración del inhibidor de mTOR comenzando al menos entre 1 día y 14 días después de la primera dosis de dicho *Mycobacterium*.

10 En una realización adicional de la invención, la cantidad eficaz del inhibidor de mTOR, opcionalmente entre aproximadamente 0,5 mg/día y aproximadamente 40 mg/día, tal como entre aproximadamente 1,5 mg/día y aproximadamente 15 mg/día, opcionalmente por vía oral, se puede administrar en múltiples dosis diarias (repetidas), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, o veinte o más dosis repetidas, antes, simultáneamente y/o después de la administración de *Mycobacterium*. Por ejemplo, tanto el *Mycobacterium* como el inhibidor de mTOR se administran y se repiten en al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 o más ocasiones, opcionalmente en donde el inhibidor de mTOR se administra diariamente.

15 En una realización adicional de la invención, la cantidad eficaz del inhibidor de mTOR, opcionalmente entre aproximadamente 0,5 mg/día y aproximadamente 40 mg/día, tal como entre aproximadamente 1,5 mg/día y aproximadamente 20 mg/día, o entre aproximadamente 5 mg/día y 10 mg/día, opcionalmente por vía oral y cuando el inhibidor de mTOR es everolimus, se puede administrar en múltiples dosis diarias (repetidas), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, o veinte o más dosis repetidas, antes, simultáneamente y/o después de la administración del *Mycobacterium*.

20 En una realización adicional de la invención, la cantidad eficaz del inhibidor de mTOR, opcionalmente entre aproximadamente 0,5 mg/día y aproximadamente 40 mg/día, tal como entre aproximadamente 2 mg/día y aproximadamente 6 mg/día, opcionalmente por vía oral y cuando el inhibidor de mTOR es rapamicina, puede administrarse en múltiples dosis diarias (repetidas), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, o veinte o más dosis repetidas, antes, simultáneamente y/o después de la administración de *Mycobacterium*.

25 El *Mycobacterium* se puede administrar al paciente a través de la vía parenteral, oral, sublingual, nasal o pulmonar. En una realización preferida, el *Mycobacterium* se administra a través de una vía parenteral seleccionada de inyección subcutánea, intradérmica, subdérmica, intraperitoneal, intravenosa e intravesicular. Más preferiblemente, la administración por vía parenteral no comprende inyección intratumoral de extracto de pared celular micobacteriana.

30 Un esquema de dosificación según la presente invención puede incluir la administración de *Mycobacterium* entre aproximadamente 0,25 horas y aproximadamente 2 semanas antes y durante el día de dicha administración de inhibidor de mTOR, seguido de dosis adicionales de dicho *Mycobacterium* entre aproximadamente cada dos días o aproximadamente cada 2 semanas o aproximadamente 4 semanas después. Pueden administrarse dosis adicionales de *Mycobacterium* a intervalos diarios o semanales o quincenales o mensuales, tales como durante un período aproximadamente de 8 semanas, o aproximadamente 10 semanas y aproximadamente 12 semanas, o más. El *Mycobacterium* puede continuar administrándose hasta 12 meses o más después de la primera dosis administrada.

35 El sujeto que debe someterse a la terapia de inhibidor de mTOR según la presente invención puede hacerlo simultáneamente, por separado o secuencialmente con la administración de *Mycobacterium*. El *Mycobacterium* se puede administrar al paciente antes de la administración de un inhibidor de mTOR. Más específicamente, el *Mycobacterium* se puede administrar al paciente entre aproximadamente 4 semanas y aproximadamente 1 día o menos antes de la administración del inhibidor de mTOR. Alternativamente, el *Mycobacterium* se puede administrar como una o más alícuotas que contienen cada una una cantidad eficaz de *Mycobacterium* que puede administrarse en uno o más intervalos de tiempo entre 4 semanas y aproximadamente 1 día o menos antes de la administración del inhibidor de mTOR y/o el *Mycobacterium* se puede aplicar después de la administración de un inhibidor de mTOR. En una forma adicional, el *Mycobacterium* se puede administrar como una o más alícuotas, cada una de las cuales contiene una cantidad eficaz de *Mycobacterium* que se puede administrar en uno o más intervalos de tiempo entre 4 semanas y aproximadamente 1 día o menos después del inhibidor de mTOR y/o se puede aplicar el *Mycobacterium* después de la administración de un inhibidor de mTOR y se repite al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 o más veces antes y/o después de la administración de un inhibidor de mTOR.

40 En una realización preferida de la invención hay un *Mycobacterium* para uso en el tratamiento de enfermedad neoplásica en combinación con un inhibidor de mTOR en donde dicho *Mycobacterium* se administra al sujeto antes, simultáneamente y/o después de que se administre el inhibidor de mTOR.

45 En una realización preferida adicional de la invención hay un *Mycobacterium* para uso en el tratamiento de enfermedad neoplásica en combinación con un inhibidor de mTOR en donde se administra al sujeto antes, simultáneamente y/o después de que se administre dicho inhibidor de mTOR, en donde dicho *Mycobacterium* y/o inhibidor de mTOR se debe administrar en dosis repetidas.

50 En una realización adicional de la invención se encuentra un método para prevenir, tratar, reducir, inhibir y/o controlar una neoplasia, tumor o cáncer primario, en un sujeto, en donde dicho método comprende administrar

simultáneamente, por separado o secuencialmente al sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) un inhibidor de mTOR, y (ii) un *Mycobacterium* de células enteras, en donde dicho *Mycobacterium* se administra al sujeto antes, simultáneamente y/o después de que se administre dicho inhibidor de mTOR, opcionalmente en donde dicho *Mycobacterium* y/o inhibidor de mTOR se debe administrar en dosis repetidas.

En otra realización preferida de la invención es un método para prevenir, tratar, reducir, inhibir y/o controlar la formación o establecimiento de metástasis de una neoplasia, tumor o cáncer primario en uno o más sitios distintos de una neoplasia, tumor o cáncer primario, en donde dicho método comprende administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente al sujeto, una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) un inhibidor de mTOR, y (ii) un *Mycobacterium* de células enteras, en donde dicho *Mycobacterium* se administra al sujeto antes, simultáneamente y/o después de que se administre dicho inhibidor de mTOR, opcionalmente en donde dicho *Mycobacterium* y/o inhibidor de mTOR se debe administrar en dosis repetidas.

En una realización de la presente invención, el *Mycobacterium* puede estar en la forma de un medicamento administrado al paciente en una forma de dosificación.

En una realización adicional de la invención, la cantidad eficaz de *Mycobacterium* se puede administrar como una dosis única. Alternativamente, la cantidad eficaz de *Mycobacterium* se puede administrar en dosis múltiples (repetidas), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, o veinte o más dosis repetidas. Por ejemplo, el *Mycobacterium* se administra entre aproximadamente 4 semanas y aproximadamente 1 día o menos antes de la administración del inhibidor de mTOR. La administración se puede presentar en dosis únicas o múltiples.

En otra realización adicional de la invención, la cantidad eficaz del *Mycobacterium* se puede administrar en múltiples dosis (repetidas), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, o veinte o más dosis repetidas concomitantemente con la administración de un inhibidor de mTOR. Por ejemplo, tanto el *Mycobacterium* como el inhibidor de mTOR se administran y se repiten al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 o más ocasiones, opcionalmente en donde el inhibidor de mTOR se administra diariamente. La administración tanto del *Mycobacterium* como del inhibidor mTOR puede presentarse en dosis múltiples.

En otra realización adicional de la invención, la cantidad eficaz del inhibidor de mTOR, opcionalmente entre aproximadamente 0,5 mg/día y aproximadamente 40 mg/día, tal como entre aproximadamente 1,5 mg/día y aproximadamente 20 mg/día, o entre aproximadamente 5 mg/día y 10 mg/día, opcionalmente por la vía oral, se pueden administrar en múltiples dosis diarias (repetidas), por ejemplo dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, diez o más, o veinte o más dosis repetidas, antes, simultáneamente y/o después de la administración de *Mycobacterium*. Por ejemplo, tanto el *Mycobacterium* como el inhibidor de mTOR se administran y se repiten al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 o más ocasiones, opcionalmente en donde el inhibidor de mTOR es administrado diariamente.

Un recipiente según la invención en ciertos casos, puede ser un vial, una ampolla, una jeringa, una cápsula, un comprimido o un tubo. En algunos casos, las micobacterias pueden ser liofilizadas y formuladas para resuspensión antes de la administración. Sin embargo, en otros casos, las micobacterias se suspenden en un volumen de un líquido farmacéuticamente aceptable. En algunas de las realizaciones más preferidas se proporciona un recipiente que comprende una dosis unitaria única de micobacterias suspendidas en un vehículo farmacéuticamente aceptable en donde la dosis unitaria comprende aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{10} CFU de micobacterias. En algunas realizaciones muy específicas, el líquido que comprende micobacterias suspendidas se proporciona en un volumen entre aproximadamente 0,1 ml y 10 ml, o entre aproximadamente 0,3 ml y 2 ml o entre aproximadamente 0,5 ml y 2 ml. Se entenderá además que en ciertos casos una composición que comprende micobacterias en un medio de contención se congela (es decir, se mantiene a menos de aproximadamente cero grados Celsius). Las composiciones anteriores proporcionan unidades ideales para aplicaciones inmunoterapéuticas descritas en la presente invención.

Las realizaciones discutidas en el contexto de un método y/o composición de la invención se pueden emplear con respecto a cualquier otro método o composición descritos en la presente invención. Por lo tanto, una realización que pertenece a un método o composición se puede aplicar también a otros métodos y composiciones de la invención.

En algunos casos se administran micobacterias no patógenas matadas por calor a sitios específicos sobre o en un sujeto. Por ejemplo, las composiciones de micobacterias de acuerdo con la invención, tales como aquellas que comprenden *M.obuense* en particular, se pueden administrar adyacentes a tumores o adyacentes a ganglios linfáticos, tales como aquellos que drenan tejido que rodea a un tumor. Así, en ciertos casos, los sitios de administración de la composición micobacteriana pueden estar cerca de los ganglios linfáticos cervicales, tonsilares, axilares, inguinales, cervicales anteriores, submandibulares, submentales o superclaviculares. Tales sitios de administración pueden estar en el lado derecho, en el lado izquierdo, o en ambos lados del cuerpo. En ciertas realizaciones muy específicas, las composiciones micobacterianas se administran cerca de los ganglios linfáticos axilares, cervicales y/o inguinales. Por ejemplo, una dosificación de las micobacterias se puede distribuir en tejidos adyacentes al ganglio linfático axilar derecho e izquierdo y los ganglios linfáticos inguinales derecho e izquierdo.

En una realización muy específica, se administra una dosificación de micobacterias a un sujeto mediante inyección intradérmica, en donde la dosificación se distribuye a ambos lados axilares e inguinales del cuerpo y en donde hay dos inyecciones (es decir, dos habones) en cada lado.

5 En algunas realizaciones adicionales de la invención, los métodos de la invención implican la administración de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis de micobacterias separadas por un período de un día o más. Por ejemplo, estas dosis separadas pueden separarse por un solo día, o varios días, una semana, dos semanas, un mes o más. Por ejemplo, los métodos según la invención pueden comprender la administración de 1 a 5 dosis de micobacterias durante un periodo de tres semanas o más. En otras formas de realización adicionales, los métodos de la invención
10 comprenden administrar de 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 2 dosis de micobacterias durante un periodo de aproximadamente una a aproximadamente tres semanas o más. Cada dosis administrada puede ser la misma o diferente dosis con respecto a una administración de dosis anterior o posterior. Por ejemplo, en ciertos casos, se prefiere que una dosis de micobacterias sea menor que una dosis cualquiera que se haya administrado previamente. Así, en algunos casos específicos, se administrará una dosis de micobacterias no patógenas matadas por calor a
15 aproximadamente la mitad de la dosis que se administró en cualquier tratamiento previo. Tales métodos pueden ser preferidos en ciertos casos en los que la respuesta inmunitaria del sujeto a las micobacterias es mayor durante las terapias subsiguientes. Así, en ciertos casos, el *Mycobacterium* se puede administrar un número mínimo de veces por ejemplo, en menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o menos administraciones de dosis separadas. En algunos casos, la composición de micobacterias se administra dos veces. Alternativamente, el *Mycobacterium* se puede administrar durante el período de tiempo en que el cáncer o tumor(es) están presentes en un paciente o hasta que el cáncer haya retrocedido o estabilizado. El *Mycobacterium* también se puede seguir administrando a los pacientes una vez que el cáncer o el tumor ha retrocedido o se ha estabilizado.

Las composiciones de micobacterias según la invención comprenderán una cantidad eficaz de micobacterias típicamente dispersas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutico" o
25 "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene micobacterias será conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, como se ejemplifica por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración animal (por
30 ejemplo, humana), se entenderá que los preparados deben cumplir con las normas de esterilidad, piogenia, seguridad general y pureza. Un ejemplo específico de un vehículo farmacológicamente aceptable como se describe en la presente invención es tampón de borato o solución salina estéril (NaCl al 0,9%).

Como se utiliza en la presente invención, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye uno cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, retardadores de absorción, sales, conservantes,
35 fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como serían conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329).

40 En una realización preferida, el *Mycobacterium* se administra a través de una vía parenteral seleccionada entre inyección subcutánea, intradérmica, subdérmica, intraperitoneal, intravenosa e intravesicular. La inyección intradérmica permite el suministro de una proporción completa de la composición de micobacterias a una capa de la dermis que es accesible a la vigilancia inmune y, por tanto, capaz de elegir una respuesta inmunitaria anticancerosa y promover la proliferación de células inmunes a los ganglios linfáticos locales. Así, en ciertos casos, las
45 micobacterias matadas por calor de la presente invención se pueden administrar por inyección, infusión, infusión continua, por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesical, mucosal, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, tópica, local, por inhalación (p.ej. inhalación de aerosol), a través de un catéter, a través de un lavado, o
50 por cualquier otro método o cualquier combinación de lo anterior como sería conocido por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990). Más preferiblemente, la administración por vía parenteral no comprende la inyección intratumoral de extracto de pared celular micobacteriana.

Todas las publicaciones mencionadas en la descripción anterior se incorporan aquí por referencia. Varias
55 modificaciones y variaciones de los métodos y sistema descritos de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y el espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas preferidas, se debería entender que la invención como se reivindica no debería estar indebidamente limitada a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son evidentes para los expertos en
60 bioquímica e inmunología o campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

La invención se describe además con referencia al siguiente ejemplo no limitativo.

Ejemplo 1

5 Este ejemplo describe un estudio que investiga la administración de células enteras de *Mycobacterium obuense* (IMM-101) matadas por calor y el inhibidor de mTOR Rapamicina (Sirolimus) en un modelo de cáncer pancreático en ratones genéticos (adenocarcinoma ductal pancreático) bien validado y clínicamente relevante. Ratones genéticamente modificados que llevan mutaciones en Kras y Pdx-Cre (ratones KC) se criaron de acuerdo con el método descrito por Hingorani et al. (Cancer Cell, 2003, 4: 437 - 50); una proporción de estos ratones desarrollan lesiones ductales similares a las neoplasias intraepiteliales pancreáticas humanas que pueden progresar a adenocarcinoma invasivo y metastásico. Se inyectaron ratones KC con 10⁵ células KPC que portaban una mutación en Kras, p53 y Pdx-Cre (Hingorani y col., Cell, 2005, 7: 469-48) en posición ortotópica el día 100 después del nacimiento. Los ratones se trataron como sigue el día 114 (día 0 en la Figura 1):

- 12 ratones no tratados (control);
- 12 ratones tratados con 2 mg/Kg de rapamicina, vía intraperitoneal, diariamente, durante la duración del estudio;
- 15 - 12 ratones tratados con inyecciones subcutáneas alternas de 0,1 mg de IMM-101/ratón en el pescuezo y en la base de la cola en días alternos durante un período de 5 días con una pausa de 2 días durante el periodo del estudio;
- 12 ratones tratados con la combinación de rapamicina e IMM-101 a una dosis y un esquema descritos anteriormente para los dos compuestos utilizados individualmente.

20 Como se esperaba, los ratones que no fueron tratados sucumbieron a la enfermedad en 20 días. El tratamiento con un inhibidor de mTOR no tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia, de modo que los ratones tratados con rapamicina vivieron lo mismo que los animales control. Sin embargo, lo más sorprendente es que la combinación de un inhibidor de mTOR (rapamicina) y micobacterias (IMM-101) prolongó significativamente la supervivencia de dichos ratones tratados en comparación con los ratones control y lo más importante en comparación con los ratones tratados con los compuestos utilizados individualmente (véase la Figura 1). Parece que la combinación de los efectos de la inhibición de mTOR con los mediados por un *Mycobacterium* actúa en sinergia de una manera inesperada, lo cual no se puede explicar por sus efectos cuando se utiliza individualmente.

Referencias

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Cancer is not just a disease of a tissue: it is a host disease. How to reactivate host defense against tumours using conventional therapies of cancer? *Ann Endocrinol (Paris)* 2008a;69:151-152.

Apetoh L, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Molecular interactions between dying tumour cells and the innate immune system determine the efficacy of conventional anticancer therapies. *Cancer Res* 2008b;68:4026-30.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:329-360.

Hingorani SR, Petricoin III EF, Maitra A, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003; 4:437-450.

Hingorani SR, Wang L, Multani AS et al. *Trp53R172H* and *KrasG12D* cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cell Cancer* 2005; 469-483.

Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumour-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2008;14:2413-2420.

Locher C, Conforti R, Aymeric L, et al. Desirable cell death during anticancer chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1209:99-108.

Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, et al. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 2008; 118:1991-2001.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un *Mycobacterium* de célula entera para uso en el tratamiento de enfermedad neoplásica en combinación con un inhibidor de mTOR, en donde el *Mycobacterium* es un *Mycobacterium* no patógeno matado por calor.
2. Un *Mycobacterium* para uso según la reivindicación 1, en donde dicho *Mycobacterium* se selecciona entre *M. vaccae*, *M. obuense*, *M. parafortuitum*, *M. aurum*, *M. indicus pranii*, *M. phlei* y combinaciones de los mismos.
- 10 3. Un *Mycobacterium* para uso según la reivindicación 2, en donde el *Mycobacterium* es una variante rugosa.
4. Un *Mycobacterium* para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho inhibidor de mTOR se selecciona entre sirolimus, everolimus, ridaforolimus, temsirolimus o metformina, y combinaciones de los mismos.
- 15 5. Un *Mycobacterium* para uso según la reivindicación 4, en donde dicho inhibidor de mTOR es rapamicina (sirolimus).
6. Un *Mycobacterium* para uso según cualquier reivindicación precedente anterior, en donde dicho *Mycobacterium* se administra a un sujeto antes, simultáneamente y/o después de que se administre dicho inhibidor de mTOR.
- 20 7. Un *Mycobacterium* para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho *Mycobacterium* y/o inhibidor de mTOR son para administrar en dosis repetidas.
8. Un *Mycobacterium* para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde dicha enfermedad neoplásica es cáncer uterino, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro, cáncer hepatocelular, linfoma, leucemia, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, melanoma, carcinoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel o sarcoma de tejido blando.
- 25 9. Un *Mycobacterium* para uso según la reivindicación 8, en donde dicha enfermedad neoplásica es cáncer de páncreas.
10. Un *Mycobacterium* para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde dicho tratamiento reduce el tamaño de un tumor canceroso de manera que es operable y/o reduce la formación de metástasis.
- 30 11. Un *Mycobacterium* para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el *Mycobacterium* está presente en una dosis unitaria que comprende una cantidad eficaz entre 10^7 y 10^9 células de *Mycobacterium* matada por calor no patógena.
- 35 12. Un *Mycobacterium* para uso según cualquier reivindicación precedente, en donde el *Mycobacterium* es para administración vía parenteral, oral, sublingual, nasal o pulmonar.
13. Un *Mycobacterium* para uso según la reivindicación 12, en donde la vía parenteral se selecciona entre inyección subcutánea, intradérmica, subdérmica, intraperitoneal, intravenosa o intravascular.
- 40 14. Un *Myconbacterium* para uso según la reivindicación 13, en donde el *Mycobacterium* es para administración vía intradérmica.

Figura 1

