

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 633 932**

(21) Número de solicitud: 201600160

(51) Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)
A61K 47/69 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:

24.02.2016

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

26.09.2017

Fecha de concesión:

23.07.2018

(45) Fecha de publicación de la concesión:

30.07.2018

(73) Titular/es:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
MARQUÉS DE VALDECILLA (95.0%)
Avda. Cardenal Herrera Oria s/n
39011 Santander (Cantabria) ES y
SERVICIO CÁNTABRO DE SALUD (5.0%)**

(72) Inventor/es:

**ÁLVAREZ DOMÍNGUEZ, Carmen;
CALDERÓN GONZÁLEZ, Ricardo;
FRANDE CABANES, Elisabet;
FERRÁNDEZ FERNÁNDEZ, Eva;
YÁÑEZ DÍAZ, Sonsoles;
PENADÉS ULLATE, Soledad;
MARRADI, Marco y
GARCÍA MARTÍN, Isabel**

(54) Título: **Uso de un complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ para el tratamiento y la prevención del cáncer.**

(57) Resumen:

Uso de un complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ para el tratamiento y la prevención del cáncer.

La presente invención se refiere al uso de un complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ para proporcionar respuestas inmunitarias para el tratamiento o profilaxis del cáncer.

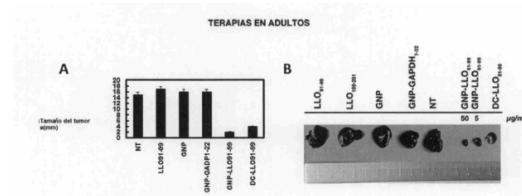


FIG. 1

"Uso de un complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ para el tratamiento y la prevención del cáncer"

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere al uso de un complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ para proporcionar respuestas inmunitarias para el tratamiento o profilaxis del cáncer.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10

La capacidad natural del sistema inmunitario para detectar y destruir células anormales podría prevenir la formación de muchos tipos de cáncer. No obstante, algunos cánceres logran evitar ser detectados y destruidos por el sistema inmunitario, debido a la producción de señales que reducen la capacidad del sistema inmunitario de detectar y destruir las células tumorales, o es posible que tengan modificaciones que hagan más difícil que el sistema inmunitario los reconozca y los ataque.

15

En este sentido, las inmunoterapias son tratamientos que restauran o intensifican la capacidad del sistema inmunitario para combatir el cáncer. En apenas pocos años, el rápido avance de la disciplina de inmunología del cáncer ha producido varios métodos nuevos para tratarlo que aumentan la potencia de las respuestas inmunitarias contra los tumores. Estas terapias estimulan las actividades de componentes específicos del sistema inmunitario o contrarrestan las señales producidas por las células cancerosas que suprimen las respuestas inmunitarias.

20

Particularmente, las denominadas vacunas para el tratamiento del cáncer o vacunas terapéuticas, están diseñadas con el fin de tratar cánceres ya existentes mediante el fortalecimiento de las defensas naturales del organismo para combatir el cáncer. Las vacunas para el tratamiento pueden actuar de varias maneras:

25

- demorar o detener el crecimiento de las células cancerosas;
- causar la reducción del tumor;
- prevenir que el cáncer vuelva a formarse; o
- eliminar las células cancerosas que no han sido destruidas con otras formas de tratamiento.

La formulación de vacunas de tratamiento contra el cáncer eficaces requiere un conocimiento detallado de cómo interactúan las células del sistema inmunitario y las células cancerosas. Para ser eficaces, las vacunas de tratamiento contra el cáncer deben estimular respuestas inmunitarias específicas dirigidas al blanco correcto. Las 5 respuestas inmunitarias también deben tener la potencia suficiente para traspasar las barreras que usan las células cancerosas para protegerse de los ataques de las células B y las células T citolíticas.

Por otro lado, la atención de las nanopartículas de oro (AuNPs) ha crecido 10 recientemente, sobre todo en cuanto a sus aplicaciones en biomedicina, como el tratamiento del cáncer y la inmunización por nano-vacunas. El interés para este tipo de nanopartículas viene dado por su capacidad para penetrar los vasos sanguíneos y las barreras de tejido y para ser dirigido a una célula específica por medio de moléculas funcionalizadas específicamente (Cristina Popescu, R. et al. *Current topics in medicinal chemistry*, 2015, 15(15), 1532-1542.)

Recientemente, se han descrito gluconanopartículas de oro (Au-GNP) cargadas con el péptido procedente *Listeria monocytogenes* listeriolisina O (LLO₉₁₋₉₉) con el objetivo de obtener una vacuna eficaz contra el patógeno humano de *Listeria monocytogenes* 20 (Listeria). Adicionalmente, con el objetivo de mejorar la inmunogenicidad de la vacuna se hizo uso de un nuevo adyuvante AdvaxTM, un polisacárido de origen vegetal natural que cuando se cristaliza en la forma polimórfica delta, se vuelve inmunológicamente activo (Rodríguez-Del Rio E. et al. *Vaccine*, 2015, 33, 1465-1473).

25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

El objeto de la invención es proporcionar una vacuna eficaz en el tratamiento y/o prevención del cáncer. Las vacunas terapéuticas de la presente invención están constituidas por nanopartículas de oro que comprenden el péptido LLO₉₁₋₉₉. Estas 30 nanopartículas (GNP-LLO₉₁₋₉₉) logran una regresión tumoral significativa de un 90%, y evitan en más de un 95% la formación de metástasis en los pulmones.

Se probaron varias terapias frente a melanoma murino con el fin de aportar datos comparativos que demuestran el efecto técnico mejorado de la vacuna de la invención 35 frente a otras terapias antitumorales descritas con anterioridad.

En este sentido, se han empleado distintos péptidos de *Listeria monocytogenes*, entre los que se encuentran el péptido 91-99 de la listeriolisina O (LLO₉₁₋₉₉) y el péptido 1-22 de la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH₁₋₂₂), nanopartículas (nanopartículas de oro sintetizadas con distintos péptidos de *Listeria monocytogenes*), 5 o bien células dendríticas cargadas con un péptido de *Listeria monocytogenes* LLO₉₁₋₉₉).

De esta manera, se ha encontrado que las nanopartículas de oro por sí solas no logran ningún efecto terapéutico sobre el melanoma. Tampoco el péptido LLO₉₁₋₉₉ sólo como terapia. Sin embargo, este péptido sintetizado en las nanopartículas (GNP-LLO₉₁₋₉₉) si logran una regresión tumoral significativa (Figura 1) y también evitan en la 10 formación de metástasis en los pulmones (Figura 2).

Por otro lado, este efecto terapéutico es específico del péptido LLO₉₁₋₉₉ de la 15 listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*, porque otras nanopartículas sintetizadas por conjugación a otro péptido de otro factor de virulencia de *Listeria monocytogenes* como el péptido GAPDH₁₋₂₂, la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, no presenta esta actividad terapéutica frente al melanoma

20 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de una nanopartícula que comprende un núcleo de átomos de oro al que se unen covalentemente al menos:

a. un primer ligando que comprende un péptido 91-99 de la listeriolisina O procedente de *Listeria monocytogenes*; y

25 b. un segundo ligando que comprende un grupo de hidratos de carbono, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del cáncer.

30 En la presente invención, el péptido LLO₉₁₋₉₉ es el epítopo restringido-H2-Kd de listeriolisina O (LLO), y consta de los aminoácidos 91 a 99 (H-Gly-Tyr-Lys-Asp-Gly-Asn-Glu-Tyr-Ile-OH).

35 En una realización preferida, los hidratos de carbono del segundo ligando se seleccionan de la lista que comprende N-acetylglucosamina (GlcNAc), glucosa, manosa, xilosa, o fructosa. En una realización más preferida, este segundo ligando comprende glucosa.

- En otra realización preferida, las partículas pueden tener un número medio de ligandos totales unidos al núcleo metálico de oro de al menos un ligando tipo péptido y un de ligando tipo hidrato de carbono, en total dos ligandos. Más preferiblemente de 5 20 ligandos, más preferiblemente de 50 ligandos, más preferiblemente de 60 ligandos y, aún más preferiblemente, de 70 ligandos (Rojo et al., *ChemBioChem* 2004, 5, 291-297). En este sentido, el ratio glucosa: péptido puede estar comprendido entre 8:1 y 10:1 y más preferentemente entre 9:1.
- Este ratio glucosa/péptido de la nanopartícula de la invención se determina cuantitativamente a través de espectros de RMN ^1H de las soluciones de las nanopartículas a 500 MHz para identificar señales inequívocamente pertenecientes a los componentes individuales de cada ligando confirmando que la intensidad de estas señales se corresponde con las previstas según la proporción de los diferentes 10 15 ligandos en la solución original.
- En una realización preferida, las poblaciones de nanopartículas pueden tener densidades diferentes de los ligandos unidos al núcleo.
- En otra realización preferida, las nanopartículas de oro cargadas con el péptido LLO₉₁₋₉₉ presentan un tamaño nanométrico, lo que permite su captación por las células y, por tanto, la presentación del antígeno en la superficie celular.
- Preferiblemente, estas nanopartículas tienen núcleos de oro con diámetros medios de 20 25 entre 1,5 y 2,5 nm, y más preferiblemente de entre 1,8 y 2,0 nm (Rodríguez-Del Rio E. et al. *Vaccine*, 2015, 33, 1465-1473) (Figura 4). El diámetro medio de los núcleos de oro puede medirse usando técnicas bien conocidas en la materia como un microscopio electrónico de transmisión. Cuando se considera, además del núcleo de oro el ligando carbohidrato (gluconanopartícula, GNP), el diámetro medio total de las 30 35 partículas es de entre 4,5 y 5,5 nm, y finalmente el tamaño de la nanopartícula al incorporar el ligando peptídico (GNP-LLO₉₁₋₉₉) aumenta el diámetro medio entre 8 y 10 nm.
- De esta manera, en una realización preferida, el tamaño de la nanopartícula de la invención, que consiste en una gluconanopartícula de oro cargada con el péptido LLO₉₁₋₉₉ (GNP-LLO₉₁₋₉₉), se encuentra en el rango de entre 12,5 y 15,5 nm.

En otra realización preferida, las nanopartículas de la invención son solubles en agua. Esto puede usarse en su purificación y, de manera importante, significa que pueden usarse en solución para presentar el ligando inmovilizado sobre la superficie de la partícula. El hecho de que las nanopartículas sean solubles tiene la ventaja de que los ligandos se presentan en una conformación natural. Para las aplicaciones terapéuticas, las nanopartículas no son tóxicas, son solubles y estables en condiciones fisiológicas.

5 En otra realización preferida, la nanopartícula también puede comprender un marcador, como un grupo fluorescente o fluoróforo, un radionucleido, un marcador magnético, un colorante, un átomo activo en RMN o un átomo que es capaz de detectarse usando resonancia de plasmón superficial. Entre los marcadores magnéticos preferidos se incluyen los grupos paramagnéticos que comprenden Mn^{+2} , Gd^{+3} , Eu^{+2} , Cu^{+2} , V^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} o lantánidos⁺³. Entre los átomos activos en 10 RMN preferidos se incluyen Mn^{+2} , Gd^{+3} , Eu^{+2} , Cu^{+2} , V^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3} o 15 lantánidos⁺³.

20 Se entiende por "fluoróforo" cualquier compuesto que puede emitir una señal luminosa o coloreada tras su excitación. Ejemplos de fluoróforos son, aunque sin limitarnos: fluoresceína, rodamina, cumarina, cianina, y sus derivados, GFP, YFP y RFP, Oregón verde, eosina, rojo Texas, derivados de naftaleno, derivados de la cumarina, derivados de oxadiazol, derivados de pireno, derivados de oxacina (como rojo Nilo o azul Nilo), derivados de acridina, derivados de tetrapirrol, Alexa Flúor, DyLight Flúor, CY5, TAMRA, JOE o biotina.

25 Las nanopartículas de la invención se prepararon según metodología sintética ya conocida en el estado de la técnica (Rodríguez-Del Rio, E. et al. *Vaccine*, 2015, 33(12), 1465-1473), según el cual se emplean núcleos que comprenden un átomo de oro en que se emplean ligandos derivatizados con enlazadores disulfuro que 30 reaccionan con HAuCl₄ (ácido tetracloraurico), en presencia de agente reductor para producir las nanopartículas (Ejemplo 1).

35 En una realización particular, se diseñó una nanopartícula cargada con el péptido 91-99 de la listeriolisina O (LLO₉₁₋₉₉) para la vacunación profiláctica y/o terapéutica frente a melanoma.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de las nanopartículas de la invención, según se describen anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de melanoma.

- 5 En otra realización preferida, ese medicamento es una vacuna terapéutica y/ profiláctica.

En la presente invención, el término "vacunación" incluye una inmunización activa, es decir, una inducción de una respuesta inmunitaria específica debido a la 10 administración, p. ej. por las vías subcutánea, intradérmica, intramuscular, oral o nasal, de pequeñas cantidades del péptido que es reconocido por el individuo vacunado como extraño y es, por tanto, inmunogénico en una formulación adecuada.

15 En otra realización preferida, las nanopartículas de la invención pueden unirse a un tercer tipo de ligando que consiste en un adyuvante, o bien este adyuvante puede formar parte de una composición farmacéutica junto con las nanopartículas tal y como se han descrito anteriormente.

20 En la presente invención, el término "adyuvante" se refiere a un agente, mientras no posea un efecto antigénico por sí mismo, que puede estimular el sistema inmune incrementando su respuesta a la vacuna. Por ejemplo, péptidos o hidratos de carbono estimuladores de células T colaboradoras que estimulan la red inmunitaria innata. Cuando se usan adyuvantes adicionales, la invención permite el uso de un único 25 vehículo de administración para administrar tanto el antígeno como los adyuvantes, o múltiples antígenos o adyuvantes.

En otra realización preferida, las nanopartículas descritas en este documento pueden 30 formularse en composiciones farmacéuticas útiles en el tratamiento y/ prevención del cáncer, preferiblemente de melanoma.

Las pautas de administración de estas composiciones farmacéuticas incluyen las vías enteral o parenteral. La administración parenteral incluye la administración por las siguientes vías: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica (incluyendo dérmico, ocular, rectal, nasal, inhalación y aerosol) y vías sistémicas rectales. Más preferiblemente, las nanopartículas de la invención o las composiciones farmacéuticas que las 35

comprenden se administran por vía intravenosa, cutánea, subcutánea, o intraperitoneal.

En otra realización preferida, las composiciones farmacéuticas pueden estar en las 5 formas de composiciones sólidas o líquidas. Estas composiciones comprenden generalmente un vehículo de determinado tipo, por ejemplo, un vehículo sólido como gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte, o un vehículo líquido como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, o glicoles como etilénglico, propilénglico o 10 polietilénglico. Estas composiciones y preparaciones generalmente contienen al menos el 0, 1% en peso del compuesto.

Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en el lugar de la dolencia, el principio activo estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía 15 parenteral que no contenga pirógenos y tenga el pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la materia están bien capacitados para preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, soluciones de los compuestos o un derivado de los mismos, p. ej., en solución salina fisiológica, una dispersión preparada con glicerol, polietilénglico líquido o aceites.

20 Además de las nanopartículas de la invención, las composiciones farmacéuticas pueden comprender uno o más de entre un excipiente, vehículo, tampón, estabilizador, agente isotonizante, conservante o antioxidante, u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la materia. Estos materiales deberán ser no ser tóxicos y no interferir con la eficacia del principio activo. 25 La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede depender de la vía de administración.

Las composiciones farmacéuticas líquidas se formulan típicamente para que tengan 30 un pH de entre aproximadamente 3,0 y 9,0; más preferiblemente entre aproximadamente 4,5 y 8,5 y, aún más preferiblemente, entre aproximadamente 5,0 y 8,0. El pH de una composición puede mantenerse mediante el uso de un tampón como acetato, citrato, fosfato, succinato, Tris o histidina, empleando típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 mM a 50 mM. El pH de las composiciones puede 35 ajustarse por otro lado usando ácidos o bases fisiológicamente aceptables.

Generalmente, los conservantes se incluyen en las composiciones farmacéuticas para retrasar el crecimiento microbiano, extendiendo la vida de las composiciones y permitiendo el uso múltiple de la presentación. Entre los ejemplos de conservantes se incluyen fenol, metacresol, alcohol de bencilo, ácido para-hidroxibenzoico y sus ésteres, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetronio. Típicamente, los conservantes se emplean en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 1,0% (p/v).

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas se administran a un individuo en una cantidad profilácticamente eficaz o una cantidad terapéuticamente efectiva (según sea el caso, prevención o tratamiento), siendo esto suficiente para que se muestre un beneficio para el individuo.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto sometido a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes del producto de la invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término

"excipiente" se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente 5 "farmacéuticamente aceptable" debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes. Ejemplos de excipientes son aglutinantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubridores, endulzantes, saborizantes y colorizantes. Ejemplos más concretos no limitantes de excipientes aceptables son almidones, azúcares, xilitol, sorbitol, fosfato 10 de calcio, grasas esteroideas, talco, sílice o glicerina entre otros.

La "forma galénica o forma farmacéutica" es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el 15 fabricante y la forma en la que es administrada.

Un "vehículo" o portador es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea para diluir 20 cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Es vehículo es farmacéuticamente aceptable. 25 Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede 30 presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, suppositorio, inyectable, inhalante, gel, jarabe, nebulizador, microesfera o 35 aerosol, preferiblemente en forma de comprimido, cápsula, polvo, gránulo, solución, suppositorio o jarabe.

Las composiciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

5

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención puede comprender otra sustancia activa. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, donde dicha composición farmacéutica puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico. El término "principio activo" es toda materia, cualquiera que sea su origen, humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo, a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento.

10

En otra realización preferida, las nanopartículas de invención, o las composiciones farmacéuticas que las comprendan, pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

15

En una realización preferida, las composiciones de la invención se administran preferiblemente a pacientes a una dosis comprendida de entre 0,25 mg y 5,0 mg de principio activo por kg de peso corporal y día, y más preferiblemente, de entre 0,5 mg y 2,5 mg/kg/día.

20

Adicionalmente, las nanopartículas de la invención descritas pueden ser utilizados solas o en combinación con las terapias actuales para el tratamiento del cáncer, como ejemplo: cirugía, radiación, quimioterapia. Igualmente, las GNP-LLO₉₁₋₉₉ descritas administrados profilácticamente conllevan a una rápida respuesta inmune innata contra el tumor, con un subsiguiente desarrollo de una respuesta inmune adaptativa antígeno específica, enfatizando su uso en vacunas profilácticas o terapéuticas contra cáncer.

25

El término "cáncer", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la enfermedad neoplásica en la cual las células, de morfología anormal, presentan un crecimiento descontrolado llegando a generar un tumor. Ejemplos de cáncer incluyen,

pero sin limitarse, cáncer de hígado o hepatocarcinoma, de próstata, de pulmón, pancreático, de colon, de mama, cánceres ginecológicos, como el de ovario, útero, cérvix, vagina o vulva, cáncer de piel, como el melanoma, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer tiroideo, cáncer renal, 5 cáncer de cerebro, sarcoma, linfoma o leucemia.

El término "melanoma", según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier tumor resultante de la proliferación de melanocitos que aparecen de forma predominante en la piel pero también en el ojo o en el intestino e incluye, sin 10 limitación, melanomas, melanomas metastáticos, melanocarcinomas, melanoepiteliomas, melanosarcomas, melanoma in situ, melanoma que se extiende superficialmente, melanoma modular, melanoma lentigo maligno, melanoma lentiginoso acral, melanoma invasivo, lunar atípico familiar y síndrome melanoma. Preferiblemente melanoma cutáneo, melanoma in situ, melanoma que se extiende 15 superficialmente, melanoma incásico y melanoma metastásico.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la 20 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Efecto comparativo de distintas terapias frente al melanoma murino tras el establecimiento del tumor durante 7 días de forma subcutánea en la zona ventral izquierda y posterior inoculación en el tumor con diferentes terapias durante 5 días (1A). Tras estos tratamientos, se sacrificaron los ratones y recuperaron los tumores, 30 midiéndose su tamaño con un calibre (1B).

FIG. 2. Metástasis en pulmón del melanoma murino. Tras el tratamiento con diferentes terapias, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los pulmones, que se lavan con PBS. Se contaron los nódulos tumorales bajo una lupa que se observan como puntos negros en los pulmones. 35

FIG. 3. Esquema general de la GNP-LLO₉₁₋₉₉ sintetizada (3A). Estructura química de la nanopartícula con el núcleo de oro y los dos ligandos, la β-D-glucosa y el péptido LLO₉₁₋₉₉ (3B).

5 **FIG. 4.** Imagen de microscopía de transmisión electrónica (100,000 x aumento) (4A). Histograma del tamaño nanométrico del núcleo de oro de las GNP-LLO₉₁₋₉₉ (4B).

10 **FIG. 5.** Efecto comparativo de distintas terapias en neonatos frente al melanoma murino tras el establecimiento del tumor durante 5 días de forma subcutánea a ratones hembras de 9 días de edad de la cepa Balb/c y posterior inoculación en el tumor con diferentes terapias durante 5 días. Tras estos tratamientos, se sacrificaron los ratones y recuperaron los tumores, midiéndose su tamaño con un calibre.

EJEMPLOS

15 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

20 Ejemplo 1. Preparación de las nanopartículas de oro sintetizadas con péptidos LLO₉₁₋₉₉ (GNP-LLO₉₁₋₉₉) o GAPDH₁₋₂₂ (GNP-GAPDH₁₋₂₂)

Los péptidos LLO₉₁₋₉₉ y GAPDH₁₋₂₂ con una cisteamida C-terminal, LLO₉₁₋₉₉C(O)NHCH₂CH₂SH o GAPDH₁₋₂₂C(O)NHCH₂CH₂SH (1 mg, 0,85 µmol, pureza 95%) se adquieren comercialmente de GenScript y junto con el 5-(mercапto)pentyl-α-D-glucopiranosido GlcC₅SH (2,1 mg, 7,4 µmol) se disuelven en agua deuterada (750 µL). El análisis ¹H NMR de la mezcla muestra un ratio Glc:LLO₉₁₋₉₉ ~ 9:1 (e.g. 90% de Glc respecto a 10% de LLO₉₁₋₉₉ o GAPDH₁₋₂₂). Estas soluciones preparadas de los ligandos (0,011 M, 4 equivalencias) se añaden a una solución acuosa de HAuCl₄ (100 µL, 0,025 M, 1 equivalencia) seguido de una solución acuosa de NaBH₄ (67,5 µL, 1 M, 27 equivalencias) en cuatro porciones bajo una agitación rápida ("foaming"). La dispersión oscura se agita por 2h y se filtra mediante membranas de 3 KDa MWCO mediante centrifugación de filtración. El coloide negro se recupera con agua y se liofiliza (0,482 mg). El residuo se redispersa en un volumen mínimo de agua, cargada con una membrana de diálsis SnakeSkin (Pierce, 10KDa MWCO) y se dializa frente a 3 L de agua con agitación suave y se recarga con agua fresca dializada cada 8 horas

por un total de 72 horas. Tras liofilización, se obtienen 0.456 mg de GNP-LLO₉₁₋₉₉ (Figura 3) o de GNP-GAPDH₁₋₂₂.

El ratio glucosa/péptido en la GNP se determina cuantitativamente por NMR (qNMR) en un espectrómetro Bruker AVANCE 500 MHz: 0.456 mg de GNP-LLO₉₁₋₉₉ y de GNP-GAPDH₁₋₂₂ se dispersan en D₂O 99,9% (200 µL). 80 µL de estas soluciones se añaden a 40 µL de 0,05% de solución sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d₄ (TSP-d₄) en D₂O y 60 µL de D₂O. El análisis ¹H-NMR de la mezcla permite el cálculo de la cantidad de péptido en las GNP-GAPDH₁₋₂₂ y GNP-LLO₉₁₋₉₉: 8,9 µg (LLO₉₁₋₉₉)/0,182 mg (nanopartícula) UV/Vis (Beckman Coulter DU 800 espectrometro, H₂O, 0,1 mg/mL). Una banda típica de plasmón superficial se observa a 520 nm. TEM (JEOL JEM-2100F funcionando a 200 kV): una única gota (5 µL) de la dispersión acuosa (ca. 0,1 mg mL⁻¹ en MilliQ water) de las GNPs se coloca en una rejilla de cobre cubierta con una película de carbono ultrafina (*Electron Microscopy Sciences*). La rejilla se deja secar al aire durante 12 horas a temperatura ambiente.

Ejemplo 2. Estudio comparativo de reducción del tamaño del tumor entre la terapia de la invención y terapias antitumorales conocidas

Para el estudio de la reducción del tamaño del tumor haciendo uso de diferentes terapias y su comparación con la de la invención, se inocularon de forma subcutánea 1 x 10⁶ células del melanoma murino B16F10 en el flanco izquierdo ventral de ratones hembras de 8-12 semanas de edad de la cepa C57BL/6.

Tras 7 días post-inoculación, se inocularon en los tumores 50 µg/ml de las siguientes terapias durante 5 días: LLO₉₁₋₉₉ (péptido sólo de la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*, LLO₉₁₋₉₉), GNP (gluconanopartículas vacías), GNP-LLO₉₁₋₉₉ (gluconanopartículas sintetizadas con el péptido de la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*, LLO₉₁₋₉₉), GNP-GAPDH₁₋₂₂ (nanopartículas sintetizadas con el péptido de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Listeria monocytogenes*, GAPDH₁₋₂₂) o ninguna partícula (NT). También se incluyeron, como control, un vector utilizado anteriormente en terapia, células dendríticas cargadas con el péptido LLO₉₁₋₉₉ (1 x10⁶ DC-LLO₉₁₋₉₉).

Tras este tratamiento, se sacrificaron los ratones y recuperaron los tumores, midiéndose su tamaño con un calibre. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Conclusiones:

- Las nanopartículas de oro de 10 nm por sí mismas no logran ningún efecto terapéutico sobre el melanoma, tal y como se había descrito previamente (*ChemBioChem* 2004, 5, 291-297);
- El péptido LLO₉₁₋₉₉ sólo no logró ningún efecto terapéutico sobre el melanoma;
- El péptido LLO₉₁₋₉₉ sintetizado en las nanopartículas, GNP-LLO₉₁₋₉₉, sí logran una regresión tumoral significativa de un 90% (Figura 1);
- Otras nanopartículas sintetizadas por conjugación a otro péptido de otro factor de virulencia de *Listeria monocytogenes* como el péptido GAPDH₁₋₂₂ la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa no presenta esta actividad terapéutica frente al melanoma.

15 Ejemplo 3. Estudio comparativo de inhibición de metástasis entre la terapia de la invención y terapias antitumorales conocidas

Para el estudio de metástasis en pulmón del melanoma murino tras el uso de diferentes terapias y su comparación con la de la invención, se inocularon de forma subcutánea 1×10^6 células del melanoma murino B16F10 igual que en la Figura 1. Tras 7 días post-inoculación, se inocularon en los tumores 50 µg/ml de las siguientes partículas terapéuticas durante 5 días: GNP (gluconanopartículas vacías), GNP-LLO₉₁₋₉₉ (gluconanopartículas sintetizadas con el péptido de la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*, LLO₉₁₋₉₉), GNP-GAPDH₁₋₂₂ (nanopartículas sintetizadas con el péptido de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Listeria monocytogenes*, GAPDH₁₋₂₂) o ninguna partícula (NT). También se incluyeron como control el vector utilizado anteriormente en terapia que consiste en células dendríticas cargadas con el péptido LLO₉₁₋₉₉ (1×10^6 DC-LLO₉₁₋₉₉).

30 Tras este tratamiento, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los pulmones, que se lavaron con PBS. Posteriormente, se contaron los nódulos tumorales bajo una lupa que se observan como puntos negros en los pulmones.

35 La Figura 2 muestra que péptido LLO₉₁₋₉₉ sintetizado en las nanopartículas, GNP-LLO₉₁₋₉₉, evita en más de un 95% la formación de metástasis en los pulmones.

Ejemplo 4.- Estudio comparativo de reducción del tamaño del tumor en neonatos entre la terapia de invención y terapias anti-tumorales conocidas.

Para el estudio de la reducción del tamaño del tumor en neonatos haciendo uso de 5 diferentes terapias y su comparación con la de la invención, se inocularon de forma subcutánea 5×10^5 células del melanoma murino B16F10 en la zona intra-escapular de ratones hembras de 9 días de edad de la cepa Balb/c.

Tras 5 días post-inoculación, se inocularon en los tumores 50 µg/ml de las siguientes 10 terapias durante 5 días: LLO₉₁₋₉₉ (péptido sólo de la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*, LLO₉₁₋₉₉), GNP (gluconanopartículas vacías), GNP-LLO₉₁₋₉₉ (gluconanopartículas sintetizadas con el péptido de la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*, LLO₉₁₋₉₉), GNP-GAPDH₁₋₂₂ (nanopartículas sintetizadas con el péptido de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Listeria monocytogenes*, GAPDH₁₋₂₂). 15 También se incluyeron, como control, un vector utilizado anteriormente en terapia, células dendríticas cargadas con el péptido LLO₉₁₋₉₉ (1×10^5 DC-LLO₉₁₋₉₉).

Tras este tratamiento, se sacrificaron los ratones y recuperaron los tumores, midiéndose su tamaño con un calibre. Los resultados se muestran en la Figura 5.

20 *Conclusiones:*

- Las nanopartículas de oro de 10 nm por sí mismas no logran ningún efecto terapéutico sobre el melanoma, tampoco en neonatos de otra cepa de ratón como 25 Balb/c,
- El péptido LLO₉₁₋₉₉ sólo no logró ningún efecto terapéutico sobre el melanoma;
- El péptido LLO₉₁₋₉₉ sintetizado en las nanopartículas, GNP-LLO₉₁₋₉₉, sí logran una regresión tumoral significativa en neonatos de un 95% (Figura 5);
- Otras nanopartículas sintetizadas por conjugación a otro péptido de otro factor de 30 virulencia de *Listeria monocytogenes* como el péptido GAPDH₁₋₂₂ la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa no presentan esta actividad terapéutica en neonatos frente al melanoma.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ que comprende un núcleo de átomos de oro al que se unen covalentemente al menos:
 - 5 a. un ligando que consiste en un péptido 91-99 de la listeriolisina O procedente de *Listeria monocytogenes*; y
 - b. un segundo ligando que consiste en un grupo de hidratos de carbono, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención del cáncer.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1 donde el complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ comprende ligandos de glucosa.
- 15 3. Uso según la reivindicación 2 donde el complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ comprende ligandos de β-D-glucosa.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el medicamento es una vacuna terapéutica y/o profiláctica.
- 20 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el cáncer es melanoma.
6. Uso según las reivindicaciones 1 a 5, donde el complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ se administra en una dosis comprendida de entre 0,25 y 5,0 mg/kg/día.
- 25 7. Uso según la reivindicación 6, donde el complejo GNP-LLO₉₁₋₉₉ se administra en una dosis comprendida de entre 0,5 y 2,5 mg/kg/día.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el complejo GNP-30 LLO₉₁₋₉₉ se encuentra en una forma adecuada para su administración por una vía seleccionada de entre intravenosa, cutánea, subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal, tópica, y vías sistémicas rectales.
- 35 9. Uso según la reivindicación 8, donde la vía de administración se selecciona de entre intravenosa, cutánea, subcutánea, o intraperitoneal.

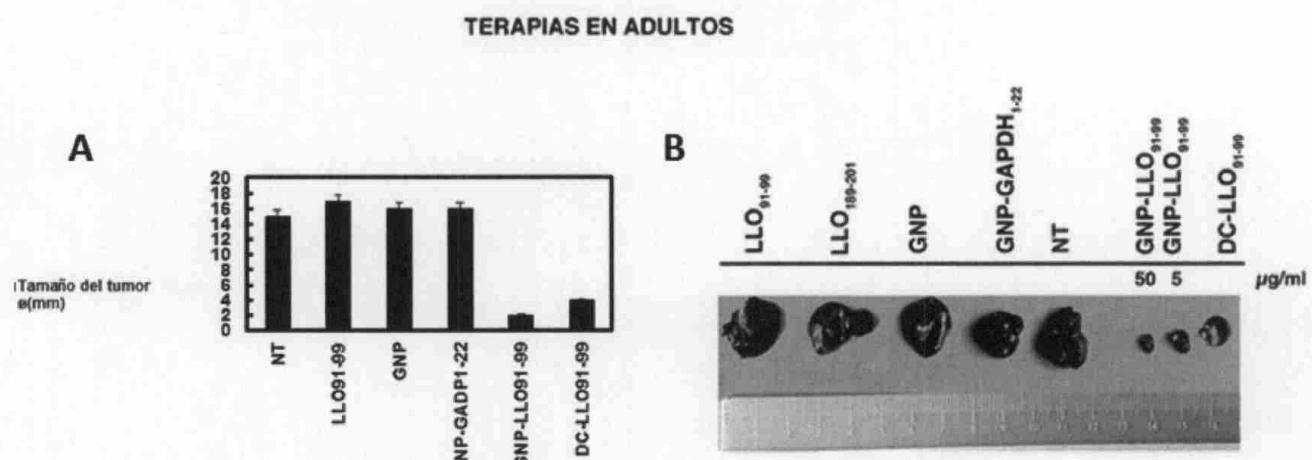


FIG. 1

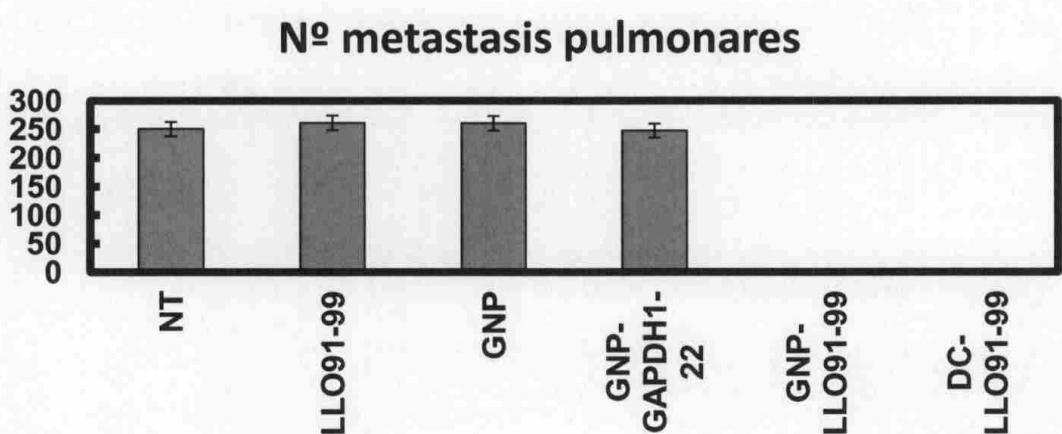


FIG. 2

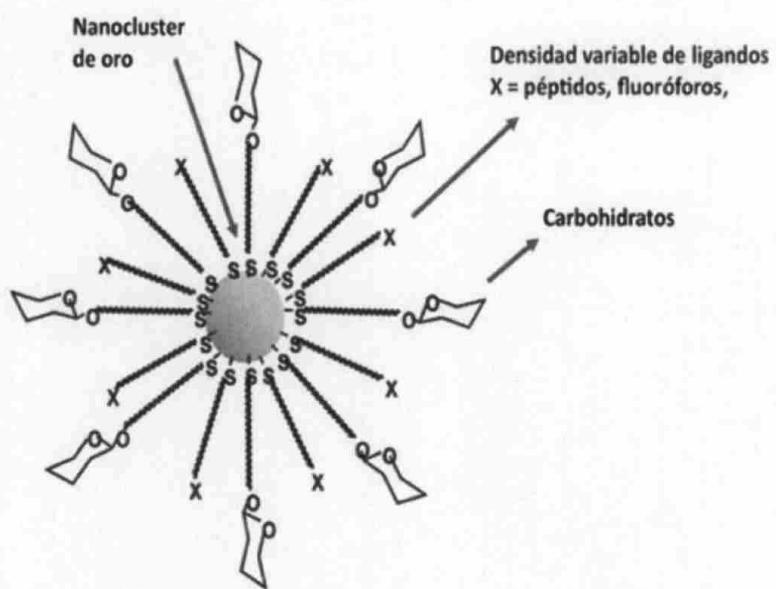
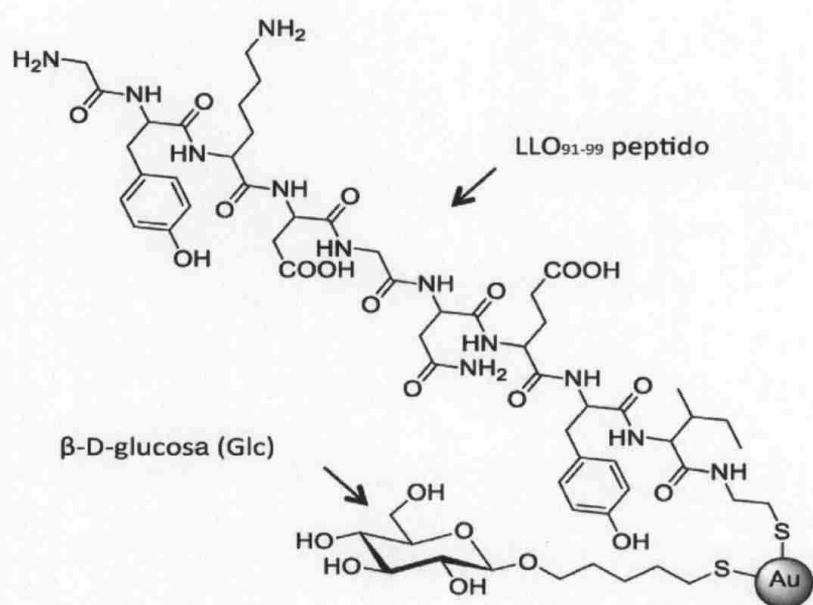
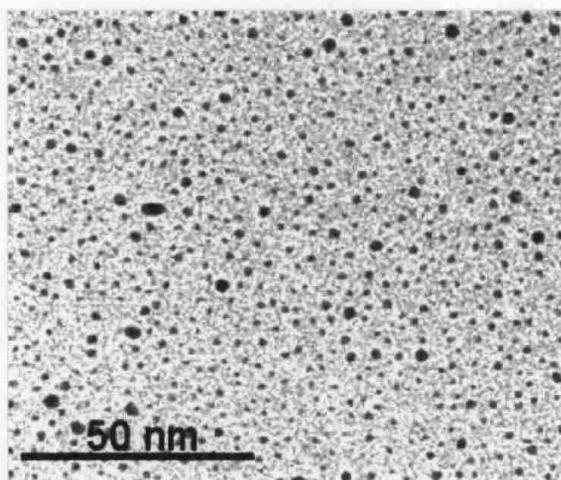
A**B**

FIG. 3

A



B

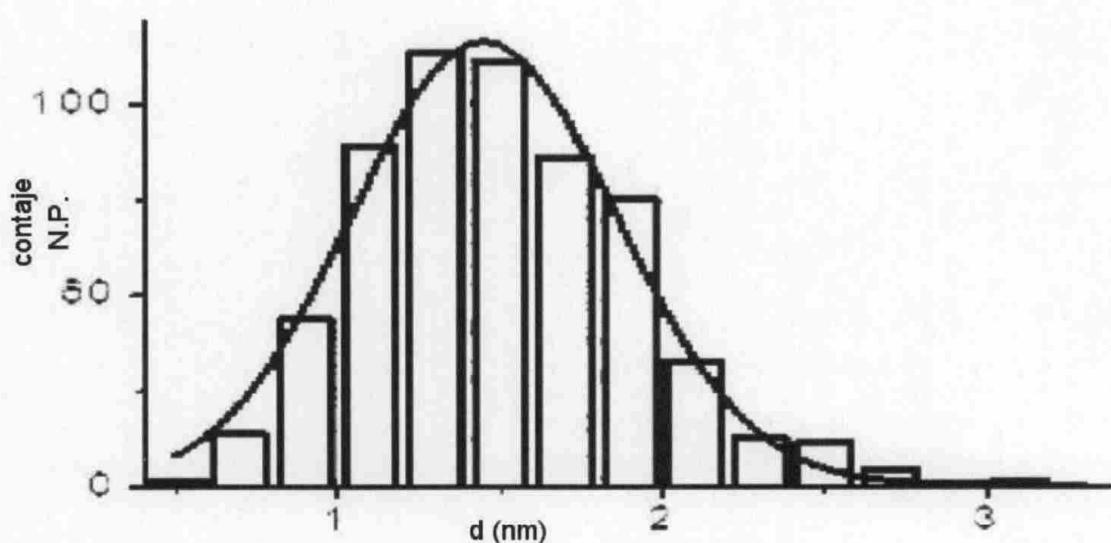


FIG. 4

TERAPIAS EN NEONATOS

GNP-LLO₉₁₋₉₉

GNP

LLO₉₁₋₉₉

GNP-GAPDH₁₋₂₂

DC-LLO₉₁₋₉₉

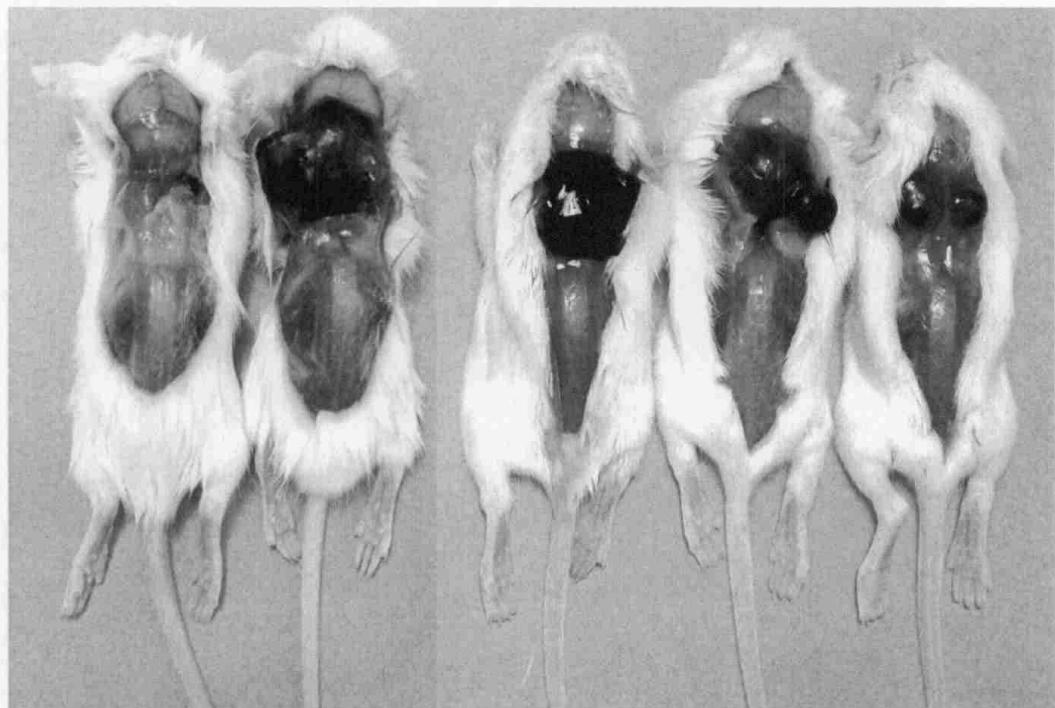


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201600160

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 24.02.2016

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(5) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	RODRIGUEZ-DEL RIO, E. et al. "A gold glyco-nanoparticle carrying a lysteriolysin O peptide and formulated with Advax TM delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection". VACCINE. 17.03.2015. Vol. 32, Nº 12, páginas 1465-1473, todo el documento.		1-9
Y	BRONCHALO-VICENTE, L. et al. "A novel therapy for melanoma developed in mice: transformation of melanoma into dendritic cells with <i>Listeria monocytogenes</i> ". PLOS ONE. 11.03.2015. Vol. 10, Nº 3, artículo e0117923, doi:10.1371/journal.pone.0117923; todo el documento especialmente texto de la Fig.4.		1-9
Y	SUN, R. et al. "Listeriolysin O as a strong immunogenic molecule for the development of new anti-tumor vaccines". HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS. Mayo 2013. Vol. 9, Nº 5, páginas 1058-1068; todo el documento, especialmente Fig.1.		1-9
Y	WO 2004014957 A1 (THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH) 19.02.2004, reivindicaciones 24, 25, 90, 99, 100.		1-9
Y	WO 2006099448 A2 (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 21.09.2006, páginas 24, 25, apartados 64, 65; SEQ ID nº 1; reivindicaciones.		1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 29.09.2016	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/6
--	---------------------------------	---------------



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201600160

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 24.02.2016

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LIN, A.Y. et al. "High-density sub-100-nm peptide-gold nanoparticle complexes improve vaccine presentation by dendritic cells <i>in vitro</i> ". NANOSCALE RESEARCH LETTERS. 12.02.2013. Vol. 8, artículo 72, páginas 1-11, todo el documento.		1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 29.09.2016	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 2/6
--	---------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K39/02 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.09.2016

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-9
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 1-9

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

La invención consiste en el uso de un complejo de nanopartículas de oro como vacuna para tratar el melanoma. El complejo está formado por β -glucosa, nanopartículas de oro y el péptido LLO₉₁₋₉₉, derivado de la Listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RODRIGUEZ-DEL RIO, E. et al. "A gold glyco-nanoparticle carrying a lysteriolysin O peptide and formulated with Advax™ delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection". VACCINE. 17.03.2015. Vol. 32, Nº 12, páginas 1465-1473.	17.03.2015
D02	BRONCHALO-VICENTE, L. et al. "A novel therapy for melanoma developed in mice: transformation of melanoma into dendritic cells with <i>Listeria monocytogenes</i> ". PLOS ONE. 11.03.2015. Vol. 10, Nº 3, artículo e0117923, doi:10.1371/journal.pone.0117923.	11.03.2015
D03	SUN, R. et al. "Listeriolysin O as a strong immunogenic molecule for the development of new anti-tumor vaccines". HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS. Mayo 2013. Vol. 9, Nº 5, páginas 1058-1068.	Mayo 2013
D04	WO 2004014957 A1 (THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH)	19.02.2004
D05	WO 2006099448 A2 (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION)	21.09.2006
D06	LIN, A.Y. et al. "High-density sub-100-nm peptide-gold nanoparticle complexes improve vaccine presentation by dendritic cells in vitro". NANOSCALE RESEARCH LETTERS. 12.02.2013. Vol. 8, artículo 72, páginas 1-11.	12.02.2013

El documento D01, describe el complejo de nanopartículas de oro que se utiliza en la invención y su uso como vacuna para tratar una infección producida por *Listeria monocytogenes*.

El documento D02, presenta ensayos que demuestran que la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* y su fragmento LLO₉₁₋₉₉, transforman células de melanoma en células dendríticas provocando la regresión del tumor.

El documento D03, explica los mecanismos por los cuales la listeriolisina LLO de *Listeria monocytogenes*, es efectiva como vector en inmunoterapia del cáncer al inducir una respuesta inmune de células T CD4+ y CD8+ específicas de抗ígenos tumorales. En concreto el fragmento LLO₉₁₋₉₉, es un epítopo linfocito T citotóxico (CD8+) dominante, lo que lo convierte en candidato preferente para inmunoterapia tumoral.

Los documentos D04 y D05, describen vacunas para el tratamiento de distintos tumores, entre los que se encuentra el melanoma, que utilizan el fragmento LLO₉₁₋₉₉, de la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*.

El documento D06, describe la mejora que supone en inmunoterapia del cáncer, utilizar nanoparticulas de oro como "transportadoras" de抗ígenos tumorales (vacunas) a las células dendríticas.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

NOVEDAD

Reivindicaciones 1-9

No se ha encontrado descrito en el estado de la técnica, el uso de complejos de nanopartículas de oro- LLO₉₁₋₉₉ para el tratamiento/profilaxis del cáncer en general y en particular el melanoma. Las reivindicaciones 1-9, cumplen el requisito de novedad del Artículo 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

ACTIVIDAD INVENTIVA

Reivindicaciones 1-9

Los documentos más relevantes para valorar la actividad inventiva en combinación con el documento D01, son los documentos D02-D05.

En el documento D01, se describe el mismo complejo de nanopartículas de oro que se utiliza en la presente invención y su uso como vacuna para tratar una infección producida por *Listeria monocytogenes*. El complejo está formado por nanopartículas de oro, el péptido LLO₉₁₋₉₉ derivado de la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes* y β-glucosa.

El péptido LLO₉₁₋₉₉ está ampliamente descrito en el estado de la técnica como epítopo linfocito T citotóxico (CD8+) dominante. Por esa característica se utiliza en inmunoterapia del cáncer, como describen los documentos D03-D05 y en particular en inmunoterapia del melanoma, el documento D02.

Teniendo en consideración el contenido de los documentos D01-D05, se considera que el uso del complejo β-glucosa-nanopartículas de oro- LLO₉₁₋₉₉, como vacuna para tratar el cáncer y en particular el melanoma, resultaría obvio para un experto en la materia. Las reivindicaciones 1-9, no cumplen el requisito de actividad inventiva del Artículo 8 de la Ley de Patentes 11/1986.