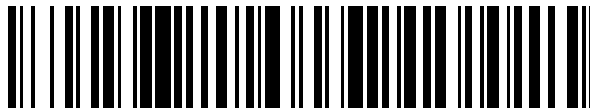


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 373**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7032 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2015 PCT/GB2015/051368**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15170121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15724353 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 3139931**

54 Título: **Composiciones que contienen glucolípidos para ser usadas en el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

09.05.2014 US 201461991060 P

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

15.01.2019

73 Titular/es:

**AGALIMMUNE LIMITED (100.0%)
1st Floor Thavies Inn House 3-4 Holborn Circus
London EC1N 2HA, GB**

72 Inventor/es:

**GALILI, URI;
PICKFORD, CHRISTOPHER y
GRIFFITHS, GRAHAM JOHN CHARLES**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 696 373 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

Composiciones que contienen glucolípidos para ser usadas en el tratamiento de tumores

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el glucolípidio con α -Gal bis(octadec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-(2R)-3-(((2-(6-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)-4-hidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)propil)amino)-6-oxohexanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (α -Gal BOEL) para ser usado en el tratamiento de tumores. La invención también se refiere a los métodos para el tratamiento de tumores que utilizan dichas composiciones.

10 Antecedentes de la invención

La causa principal de muerte en los pacientes de cáncer con tumores sólidos es la recidiva del cáncer después de la cirugía, ya que muchas metástasis no se pueden extirpar y/o no responden a ningún tratamiento. La mayoría de estos pacientes se considera que tienen un cáncer terminal. Dado que no hay ningún tratamiento disponible para ellos, muchos de estos pacientes mueren a las pocas semanas o pocos meses después de la detección de las lesiones tumorales metastásicas.

15 Los tumores se desarrollan en los pacientes con cáncer porque el sistema inmunitario no consigue detectar las células tumorales como células que se deban destruir. Las células tumorales expresan antígenos tumorales autólogos en una gran proporción de pacientes con cáncer. Estos antígenos tumorales autólogos pueden desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral protectora. Las células tumorales, o las membranas de las células tumorales, tienen que ser internalizadas por las células presentadoras de antígeno para inducir el desarrollo de una respuesta inmunitaria antitumoral. Sin embargo, el sistema inmunitario en los pacientes con cáncer «ignora» los antígenos tumorales, lo que está asociado al desarrollo precoz del tumor en un modo «furtivo», por lo que es «invisible» para las células presentadoras de antígenos (Pardoll D. M. *Clin. Immunol.* 2000; 95: S44-49; y Dunn G. P. et al. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-8).

25 Además, el microentorno del tumor y el medio local de citocinas a menudo suprimen la función inmunitaria y pueden inducir activamente la anergia y muerte de las células inmunitarias (Malmberg K. J. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004; 53: 879-92; Lugade A. A. et al. *J. Immunol.* 2005; 174: 7516-23). El tratamiento eficaz de tales lesiones tumorales metastásicas necesita dos componentes:

30 1. Destrucción de las lesiones que son suficientemente grandes como para ser detectadas a simple vista o mediante tecnología de toma de imágenes, y

2. Inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral protectora contra los antígenos tumorales. Tal respuesta inmunitaria da lugar a una inmunomediación de la detección, regresión y/o destrucción de micrometástasis que no se pueden detectar a simple vista y que no se pueden detectar mediante la toma de imágenes.

35 La inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral protectora necesita que las células presentadoras de antígeno capten las células tumorales o las membranas celulares, y que las transporten a los ganglios linfáticos de drenaje, donde las células presentadoras de antígeno procesan las moléculas de los antígenos tumorales. La mayoría de estos antígenos tumorales son específicos para uno de los pacientes. Los péptidos inmunógenos del antígeno tumoral los presentan las células presentadoras de antígeno en asociación con las moléculas del CMH de clase I o de clase II para la activación de los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ específicos del tumor, respectivamente. Sólo después de la activación de estos linfocitos T gracias a los péptidos de antígenos tumorales procesados y presentados, estos linfocitos pueden proliferar, abandonar los ganglios linfáticos, circular por el organismo, y buscar y destruir las células tumorales metastásicas que expresan los antígenos tumorales. Además, aunque si bien solo después de que sean activados, los linfocitos T cooperadores pueden ofrecer ayuda a los linfocitos B para producir anticuerpos contra los antígenos tumorales. No obstante, ya que las células tumorales evolucionan de forma natural para ser «invisibles» para las células presentadoras de antígeno, las metástasis tumorales en desarrollo suelen ser ignoradas por el sistema inmunitario hasta el punto de que las células tumorales en metástasis pueden proliferar incluso dentro de los ganglios linfáticos. Así pues, desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz necesita que las células presentadoras de antígeno actúen con eficacia sobre las células tumorales.

50 Lo que se necesita son composiciones y métodos para introducir compuestos en un tumor, tal como mediante métodos quirúrgicos o no quirúrgicos, en las condiciones tales que el compuesto se inserte en las membranas de las células tumorales y un anticuerpo que se produce de forma natural interaccione con el compuesto introducido. Se cree que tal interacción inducirá la inflamación local para que el tumor experimente una regresión y/o destrucción, y para que se envíen las células tumorales y/o las membranas de las células tumorales hacia las células presentadoras de antígeno. Este procedimiento desencadenará una respuesta inmunitaria protectora en el hospedador contra las células tumorales que expresan los antígenos tumorales en las micrometástasis que no se pueden detectar a simple vista ni mediante la toma de imágenes y, por lo tanto, no se pueden retirar por extirpación.

La patente de los EE. UU. n.º US 2006/251661 describe métodos para la administración de compuestos glucolipídicos naturales en las lesiones tumorales que inducen la expresión local de epítomos de α -Gal dentro del tumor que interacciona con el anticuerpo anti-Gal natural.

5 Por lo tanto, se necesita dar a conocer un método mejorado para incorporar las moléculas de α -Gal dentro de un tumor para activar una respuesta dependiente de anti-Gal contra el tumor, y también se necesitan nuevas composiciones farmacéuticas que faciliten este método.

Compendio de la invención

10 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende el bis(octadec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-(2R)-3-(((2-(6-(((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)-4-hidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)propil)amino)-6-oxohexanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (α -Gal BOEL) para ser usado en el tratamiento de un tumor.

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende el α -Gal BOEL en combinación con uno o varios agentes terapéuticos.

De acuerdo con otro aspecto, en la presente memoria se describe un método para tratar un tumor en un sujeto, que comprende:

a) proporcionar:

20 i) un sujeto que comprende al menos un tumor que comprende numerosas células cancerosas que tienen una superficie celular; y

ii) la composición farmacéutica, tal y como se define en la presente memoria; y

b) introducir la composición farmacéutica en el interior del tumor.

25 El uso terapéutico del α -Gal BOEL no se ha descrito anteriormente en la técnica, ni su uso específico para tratar tumores. Anteriormente se pensaba que se necesitaban glucolípidos con α -Gal con cadenas complejas y largas de glúcidos para la inducción de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, tal y como se describe en los ejemplos de la patente de los EE. UU. n.º US 2006/251661 y en Galili et al., *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 4676-4687).

30 Estos glúcidos complejos, procedentes de una fuente natural de eritrocitos de sangre de conejo, comprenden una mezcla sin fraccionar de glucolípidos con α -Gal, en donde cada uno contiene el epítomo de α -Gal. La microheterogeneidad que se obtiene de la biosíntesis de glucanos, junto a la mezcla inseparable de compuestos que se obtienen con la extracción, da lugar a un material complejo y difícil de escalar (Galili et al. (2007), véase más arriba).

Sin embargo, los inventores han hallado sorprendentemente que las moléculas que contienen un único glucolípido con α -Gal con cadenas cortas de glúcidos (tal como el grupo funcional glucídico corto del α -Gal BOEL) son eficaces para tratar los tumores y tienen el beneficio añadido de ser fáciles de producir, conservar y administrar.

35 También se cree que el α -Gal BOEL es más hidrosoluble, con lo que se facilita la formulación para la inyección. Sin querer comprometernos con la teoría, se cree que el componente espaciador del α -Gal BOEL mejora la solubilidad de la molécula.

40 En la presente memoria se presentan datos que muestran una serie de propiedades beneficiosas debidas al uso del α -Gal BOEL en el tratamiento de tumores. Por ejemplo, se ha demostrado que el α -Gal BOEL se fija con eficacia a los anticuerpos anti-Gal (véanse el ejemplo 1 y la figura 2). Además, se ha demostrado que el α -Gal BOEL tiene propiedades eficaces al inducir la lisis celular de las células cancerosas dependiente del complemento (véanse el ejemplo 2 y la figura 3), sin que esa viabilidad de las células se ves afectada en ausencia del complemento (véanse el ejemplo 2 y la figura 4), y que el α -Gal BOEL puede incorporarse con eficacia en las células tumorales (véanse el ejemplo 2 y la figura 5). Además, la incorporación del α -Gal BOEL conduce al depósito de proteínas del complemento sobre las células tumorales (ejemplo 3 y figura 6). Es más, se demuestra que el α -Gal BOEL induce una respuesta inmunitaria antitumoral protectora contra el desarrollo de metástasis lejanas en un modelo de eficacia *in vivo*. Este efecto depende de la presencia de anti-Gal en el sujeto tratado. En ausencia de anti-Gal, no se observa ninguna respuesta inmunitaria antitumoral protectora significativa (véanse el ejemplo 4 y las figuras 7 y 8). Además, las combinaciones de α -Gal BOEL y el anticuerpo anti-PD-1 muestran una actividad *in vivo* mucho mejor que la de los anticuerpos anti-PD-1 solos (véanse el ejemplo 5 y la figura 9).

Breve descripción de las figuras

Figura 1: La estructura del α -Gal BOEL.

Figura 2: Datos que demuestran que el α -Gal BOEL se fija a los anticuerpos anti-Gal.

5 Figura 3: Datos que demuestran que el α -Gal BOEL induce la lisis celular de las células cancerosas dependiente del complemento.

Figura 4: Datos que demuestran que la incorporación del α -Gal BOEL no provoca la citotoxicidad manifiesta de las células en ausencia del complemento.

Figura 5: Datos que demuestran que el α -Gal BOEL se incorpora en las células tumorales.

10 Figura 6: Datos que demuestran que la incorporación del α -Gal BOEL conduce a que las proteínas del complemento C3b y MAC en el suero humano se depositen sobre las células tumorales.

15 Figura 7: Experimentos de valoración de la dosis con α -Gal BOEL. A los ratones GT KO productores de anti-Gal se les inyectaron 1×10^6 células de melanoma B16-F10 para el crecimiento tumoral primario en el flanco derecho y 1×10^4 células B16-F10 para la inyección del tumor secundario/distal en el otro flanco. Al cabo de 5 días, los tumores primarios se trataron por vía intratumoral con PBS (círculos huecos) o 0,1 mg de α -Gal BOEL (triángulos huecos), o 0,5 mg de α -Gal BOEL (triángulos rellenos), o 1 mg de α -Gal BOEL (círculos rellenos). Se siguió durante 32 días el desarrollo de los tumorales distales visibles como modelo para el desarrollo de metástasis. En el gráfico se representa el porcentaje de ratones sin tumores distales visibles. Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron mediante la prueba de rangos logarítmicos.

20 Figura 8: Actividad de α -Gal BOEL en los ratones productores de anti-Gal (a saber, los ratones inmunizados con membranas de riñón de cerdo) o en los ratones que carecen de anti-Gal (a saber, los ratones sin inmunizar). A los ratones GT KO hiperinmunizados o sin inmunizar se les inyectaron 1×10^6 células B16-F10 para el crecimiento del tumor primario en el flanco derecho y 1×10^4 células B16-F10 para los tumores secundarios/distales en el flanco contrario. Al cabo de 4 días, los tumores primarios se trataron por vía intratumoral con PBS en los ratones hiperinmunizados (círculos huecos) o con 1 mg de α -Gal BOEL (círculos rellenos para los ratones hiperinmunizados; cuadrados huecos para los ratones sin inmunizar). Se siguió hasta el día 28 el desarrollo de los tumorales distales visibles como modelo para el desarrollo de metástasis. En el gráfico se representa el porcentaje de ratones sin tumores distales visibles. Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron mediante la prueba de rangos logarítmicos.

30 Figura 9: La combinación de α -Gal BOEL con anti-PD-1 muestra una actividad superior en el modelo de melanoma B16-F10. A los ratones GT KO productores de anti-Gal se les inyectaron 1×10^6 células B16-F10 para el crecimiento del tumor primario en el flanco derecho, y 1×10^4 células B16-F10 para los tumores secundarios/distales en el flanco contrario. Al cabo de 5 días, los tumores primarios se trataron por vía intratumoral (i.t.) con 100 μ l de PBS o 0,1 y 0,25 mg de α -Gal BOEL en 100 μ l de PBS. El día 8 o el día 10, los ratones se trataron por vía intraperitoneal (i.p.) con 200 μ l de PBS o 250 μ g de anti-PD-1 en 200 μ l de PBS. El tratamiento i.p. se repitió 3 veces en intervalos de tres a cuatro días. Se siguió durante 32 días el desarrollo de los tumorales secundarios/distales visibles como un modelo para el desarrollo de metástasis. En el gráfico se representa el porcentaje de ratones sin tumores distales visibles. Las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento se determinaron mediante la prueba de rangos logarítmicos. Una combinación de α -Gal BOEL i.t./anti-PD-1 i.p. (rombos rellenos) mostró una actividad estadísticamente significativamente superior frente a α -Gal BOEL i.t./PBS i.p. (círculos rellenos; *, $p < 0,05$), así como frente a PBS i.t./anti-PD-1 i.p. (triángulos rellenos; ***, $p = 0,0003$), y frente a PBS i.t./PBS i.p. (círculos huecos; ***, $p < 0,0001$). Se combinaron los resultados de dos experimentos independientes para el gráfico.

Descripción detallada de la invención

45 La invención descrita en la presente memoria se refiere a una composición y método que permite la inserción de glucolípidos con α -Gal (a saber, α -Gal BOEL) en la membrana celular de las células tumorales dentro de un tumor tratado. Se cree que la presencia de los glucolípidos con α -Gal en la lesión tumoral da lugar a la destrucción o a la regresión del tumor mediante el proceso inflamatorio inmunomediado que se induce por la interacción entre los anticuerpos anti-Gal naturales presentes en el sujeto y el epítipo de α -Gal del α -Gal BOEL. Además, este tratamiento convierte el tumor tratado en una vacuna que desencadena una respuesta inmunitaria antitumoral protectora sistémica que impide el desarrollo de las metástasis distantes mediante la destrucción inmunitaria de las células tumorales metastásicas.

55 La invención descrita en la presente memoria comprende una modalidad de tratamiento que incluye, pero sin limitarse a ella, la administración intratumoral de un glucolípido específico, denominado α -Gal BOEL, que lleva el epítipo de α -Gal y, por lo tanto, se le puede denominar un «glucolípido con α -Gal». El glucolípido con α -Gal se inserta en la lámina externa de la membrana celular de las células tumorales dentro de la lesión tratada. La presencia de los glucolípidos con α -Gal en la lesión tumoral consigue dos objetivos:

1. La destrucción inmunomediada de las lesiones tumorales mediante el proceso inflamatorio que se induce dentro de la lesión tumoral mediante la interacción entre el anticuerpo anti-Gal natural y los epítomos de α -Gal de los glucolípidos con α -Gal insertados en la membrana de las células tumorales; y

5 2. Que las células presentadoras de antígeno capten con eficacia las células tumorales y de las membranas de las células tumorales con los glucolípidos con α -Gal insertados y, así pues, que expresan los epítomos de α -Gal que se fijan *in situ* a los anticuerpos anti-Gal, con lo que convierte la lesión tumoral tratada en una vacuna tumoral autóloga.

Aunque no es necesario conocer el mecanismo de una invención, se cree que esta captación da lugar a una respuesta inmunitaria eficaz contra los antígenos tumorales presentes en la superficie o en el interior de las células tumorales que expresan los epítomos de α -Gal. Además, se cree que esta respuesta inmunitaria puede dar lugar a la destrucción inmunomediada de las células tumorales metastásicas que no expresan los epítomos de α -Gal, sino que expresan el antígeno tumoral.

La invención contempla la administración por inyección, o por cualquier otro medio, de compuestos en el interior de tumores, lo que inducen la expresión del epítomo de α -Gal en las células de dentro del tumor tratado. Tal administración de glucolípidos con α -Gal consigue los objetivos siguientes:

15 1. La fijación del anticuerpo anti-Gal natural a los epítomos de α -Gal de los glucolípidos con α -Gal puede dar lugar a la activación local del complemento, con lo que se generan factores quimiotácticos que incluyen, pero sin limitarse a ellos, C5a y C3a. Estos factores quimiotácticos inducen la migración extensa de las células presentadoras de antígeno, tales como, pero sin limitarse a ellas, las células dendríticas y los macrófagos, hacia el tejido tumoral.

20 2. Las colas lipídicas de los glucolípidos con α -Gal se insertarán de manera espontánea en la membrana de las células tumorales de dentro de la lesión tratada, lo que da lugar a la expresión de los epítomos de α -Gal sobre las células tumorales. Se cree que la fijación de anti-Gal a estos epítomos induce la regresión y/o destrucción de los tumores que comprenden las células tumorales.

25 3. La opsonización de la membrana de las células tumorales por el anti-Gal las dirige hacia la captación eficaz por las células presentadoras de antígeno que migran al tumor. La migración de estas células presentadoras de antígeno está dirigida por los péptidos quimiotácticos por escisión del complemento que se generan después de la fijación del anti-Gal a los glucolípidos con α -Gal dentro del tumor tratado.

Sin desear comprometerlos con ningún mecanismo concreto, se cree que la porción Fc de las moléculas de anti-Gal de tipo IgG fijadas a la membrana de las células tumorales se fija a los receptores de Fc- γ (Fc γ R) sobre las células presentadoras de antígeno e induce la captación de las células tumorales por las células presentadoras de antígeno. Se puede producir una inducción similar para la captación como resultado de la interacción entre los depósitos del componente C3b del complemento sobre las células tumorales que llevan fijadas el anti-Gal y los receptores de C3b sobre las células presentadoras de antígeno. Este envío selectivo mediado por el anti-Gal de las membranas tumorales hacia las células presentadoras de antígeno permite el transporte eficaz de los antígenos tumorales autólogos hasta los ganglios linfáticos de drenaje, y que las células presentadoras de antígeno procesen y presenten los péptidos inmunógenos del antígeno tumoral dentro de los ganglios linfáticos.

Así pues, la inyección intratumoral de los glucolípidos con α -Gal hace que una lesión tumoral tratada se convierta en una vacuna tumoral autóloga *in situ* que proporciona antígenos tumorales para el sistema inmunitario, lo que desencadena una respuesta inmunitaria antitumoral protectora. Esta respuesta inmunitaria es capaz de inducir la regresión del tumor que comprende la destrucción de células tumorales sueltas o de pequeños agregados de células tumorales (a saber, por ejemplo, micrometástasis). Estas micrometástasis suelen ser indetectables bien a simple vista o mediante toma de imágenes, y no resultan accesibles a las técnicas quirúrgicas convencionales ni a la radioterapia (a saber, no se pueden extirpar debido a su pequeño tamaño). Por lo tanto, el presente método tiene la ventaja añadida de que es capaz de tratar micrometástasis que suelen ser indetectables a simple vista o bien mediante toma de imágenes, y que no son accesibles a las técnicas quirúrgicas convencionales ni por radioterapia.

45 **Definiciones**

Las referencias en la presente memoria al término « α -Gal BOEL» se refieren a un ejemplo específico de glucolípido con α -Gal que es un lípido de bis-octadecenoato puenteado con α -Gal que tiene la estructura mostrada en la figura 1 y el nombre químico completo (de acuerdo con la convención de la IUPAC) de bis(octadec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-(2R)-3-(((2-(6-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)-4-hidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)propil)amino)-6-oxohexanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo.

El α -Gal BOEL está disponible en el mercado de Sigma-Aldrich con el nombre de producto 'FSL-Galili(tri)TM' (número de catálogo F9432). Esta construcción consiste en componentes funcional (F), espaciador (S) y lipídico (L), y se puede utilizar para insertarlo en las membranas celulares, de tal manera que la célula mostrará el componente funcional (F) en su superficie. El componente funcional del α -Gal BOEL es un grupo de trisacárido de: Gal- α 1-3-Gal- β 1-4GlcNAc (a saber, el epítomo de α -Gal). El componente espaciador es un grupo O(CH₂)₃NH y el componente lipídico es un derivado de adipato (a saber, OOC(CH₂)₄COO, la forma ionizada del ácido adípico) de la

diololeoifosfatidiletanolamina (DOPE).

- 5 El término «epítomos de α -Gal», tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula, con una estructura terminal que comprende Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R, Gal α 1-3Gal β 1-3GlcNAc-R, o cualquier cadena glucídica cuyo extremo no reductor acaba en Gal α 1-3Gal. El epítomo de α -galactosilo (también denominado «alfa-Gal» o « α -Gal»), a saber, galactosil-alfa-1,3-galactosil-beta-1,4-N-acetilglucosamina, se describe en Gallili, U. y Avila, J.L., "Alpha-Gal and Anti-Gal", *Subcellular Biochemistry*, Vol. 32, 1999. Los estudios con xenotrasplantes han determinado que los humanos orquestan una respuesta inmunitaria contra el epítomo de α -galactosilo, que por sí mismo no se suele hallar en los humanos, pero que se encuentra en otros animales y en muchos microorganismos.
- 10 El término «glucolípidos», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula con al menos una cadena de glúcidos unida a una ceramida, una cadena de ácido graso o cualquier otro lípido. Como alternativa, un glucolípido se puede denominar como un glucoesfingolípido. En una realización, el glucolípido es un derivado de adipato de diololeoifosfatidiletanolamina (DOPE).
- 15 El término «anti-Gal», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a los anticuerpos que se producen de forma natural y que se fijan al epítomo de α -Gal.
- El término « α -1,3-galactosiltransferasa», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier enzima capaz de sintetizar epítomos de α -Gal.
- El término «epítomo de fijación a anti-Gal», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula o parte de una molécula que es capaz de fijarse, *in vivo* o *in vitro*, al anticuerpo anti-Gal natural.
- 20 El término «no extirpable», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier parte de un órgano o de una estructura del organismo que no se puede retirar por intervención quirúrgica. Por ejemplo, un «tumor no extirpable» puede ser un tumor físicamente inalcanzable para las técnicas quirúrgicas convencionales, un tumor cuya retirada no mejora el cáncer global ni el bienestar del paciente, o un tumor cuya retirada puede ser perjudicial para un órgano vital.
- 25 El término «fijado a la membrana», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula que se adhiere de manera estable a una bicapa fosfolipídica, o que se incluye dentro de ella. Tal adhesión o inclusión puede implicar fuerzas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, enlaces iónicos, enlaces covalentes, fuerzas hidrófobas o fuerzas de Van der Waals, etc. Por ejemplo, una proteína que comprende una región de aminoácidos hidrófobos puede insertarse por sí sola en una membrana de bicapa fosfolipídica, o una molécula que contiene una cola lipídica puede insertarse por sí sola en la bicapa fosfolipídica de las células y llegar a quedar incluida. El componente lipídico del α -Gal BOEL se utiliza para insertarse en la membrana de las células del tumor para crear un tumor que muestra el epítomo de α -Gal en la superficie de sus células.
- 30 El término «subconjunto», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un grupo especializado cuyo número es menor que el del grupo entero. Por ejemplo, un paciente puede presentar numerosos tumores sólidos no extirpables. De esta cantidad numerosa, se puede acceder a un subconjunto mediante técnicas no quirúrgicas, mientras que no se puede acceder a otro subconjunto mediante técnicas que no sean quirúrgicas.
- 35 El término «accesible», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier capacidad para tratar un tumor sólido mediante técnicas no quirúrgicas. Tales técnicas pueden incluir, pero sin limitarse a ellas, la inyección en la piel o la inyección por vía endoscopia, broncoscopia, quistoscopia, colonoscopia, laparoscopia, cateterismo o aplicación tópica mediante una loción, ungüento o polvo. Por ejemplo, se puede acceder a un tumor sólido de ovario mediante laparoscopia. En otro ejemplo, se puede acceder a un tumor sólido de colon mediante colonoscopia.
- 40 El término «introducir», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier método con el que transferir un compuesto al interior de un tejido y posteriormente al interior de las células que están dentro de dicho tejido. Tales métodos de introducción pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, vectores víricos, vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, biobalística, lipofección y muchos vectores de ADN disponibles en el mercado y conocidos en la técnica. Como alternativa, un compuesto se puede colocar adyacente a una célula, de tal manera que el compuesto se incorpora en la célula mediante mecanismos fisiológicos (a saber, por ejemplo, interacciones hidrófobas o transporte activo). Un método de introducción comprende la inyección, en donde un compuesto se coloca directamente en el espacio intercelular dentro del tejido inyectado. Tal inyección puede ser posible cuando resulta «accesible» una parte de un órgano, acrecencia (a saber, por ejemplo, un tumor sólido) o cavidad corporal.
- 45 Los términos «en» y «al interior de», tal y como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la penetración satisfactoria de una molécula a través de una membrana celular o dentro de ella. Por ejemplo, un vector vírico se puede introducir en una célula tumoral sólida en las condiciones que hacen que la célula tumoral quede transfectada. En otro ejemplo, se puede introducir un glucolípido en una célula tumoral en las condiciones en las que el glucolípido se queda insertado en la membrana de bicapa fosfolipídica de la célula.
- 50 Los términos «regresión», «al menos se le reduce parcialmente el tamaño» o «reducido», tal y como se utilizan en la

presente memoria, se refieren a una disminución de una acrecencia en el organismo, tal como, por ejemplo, un tumor sólido. Tal disminución se puede determinar por una reducción de los parámetros medidos, tal como, pero sin limitarse a ellos, diámetro, masa (a saber, peso), o volumen. La disminución de ninguna manera indica que el tamaño se reduce completamente, sino tal solo que un parámetro medido es cuantitativamente menor que una determinación anterior.

El término «destrucción», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la degradación celular completa de una acrecencia en el organismo tal como, por ejemplo, un tumor sólido. Tal destrucción puede implicar la apoptosis intracelular, la muerte de las células mediada por linfocitos T, la citólisis dependiente del complemento y/o la fagocitosis por macrófagos, de tal manera que la acrecencia en el organismo se digiere completamente y se elimina del cuerpo. El término «destrucción de un tumor» se refiere a la reducción de un tumor a tal grado que ya no es detectable por los medios diagnósticos.

Los términos «que trata», «tratamiento» y «tratar» utilizados todos en la presente memoria pretenden hacer referencia a un procedimiento que da lugar a la disminución, al menos parcialmente, del tamaño o a la reducción del tamaño de una acrecencia en el organismo, tal como, por ejemplo, un tumor sólido.

El término «menos que todos», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un subconjunto de un grupo. En el contexto de una realización de la presente invención, se contempla el tratamiento de menos que todos de los tumores en un paciente. En otras palabras, en una realización, no es necesario tratar cada tumor mediante la introducción del epítipo de α -Gal (p. ej., mediante la introducción del α -Gal BOEL); en su lugar, la introducción de un subconjunto da lugar a una respuesta inmunitaria contra todos los tumores (incluidos los que no son objetivo directo del tratamiento). De esta manera, se puede conseguir una disminución colectiva de numerosas acrecencias en el organismo, tales como, por ejemplo, metástasis tumorales sólidas. Tal disminución se puede determinar por una reducción de los parámetros medidos, tal como, pero sin limitarse a él, el número. La disminución de ninguna manera indica que el parámetro se reduce a cero, sino tan solo que un parámetro medido es cuantitativamente menor que una determinación anterior.

El término «crecimiento», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier tejido u órgano que comprende una masa celular que se considera que representa una proliferación anormal. Tales acrecencias pueden ser cancerosas, no cancerosas, malignas o no malignas. Si una acrecencia comprende cáncer, podría ser un tumor.

El término «tumor», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una masa anormal de tejido que es el resultado de un crecimiento o división anormales de las células. Tales tumores pueden ser sólidos (a saber, una masa de células en un órgano, tejido o glándula concretos, tal como peritoneo, hígado, páncreas, pulmón, vejiga urinaria, próstata, útero, cuello uterino, vagina, mama, piel, cerebro, ganglio linfático, cabeza y cuello, estómago, intestino, colon u ovarios) o no sólidos (a saber, tumores líquidos que se desarrollan en la sangre, tal como la leucemia).

El término «sujeto», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier organismo que es capaz de desarrollar un tumor. Tales organismos incluyen, pero sin limitarse a ellos, mamíferos, humanos, mamíferos no primates, prosimios y monos del Nuevo Mundo, etc.

El término «molécula», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la partícula más pequeña de una composición que conserva todas las propiedades de la composición y que está compuesta por uno o varios átomos. Estos uno o varios átomos se disponen de tal manera que la molécula puede interactuar (a saber, iónicamente, covalentemente, no covalentemente, etc.) con otras moléculas para formar adhesiones y/o asociaciones. Por ejemplo, una molécula puede tener uno o varios átomos con tal disposición que proporciona una capacidad para una interacción con un anticuerpo anti-Gal.

Anticuerpo anti-Gal natural, epítipo de α -Gal y rechazo de xenoinjerto

Se cree que el anti-Gal es un anticuerpo natural que puede estar presente en todos los humanos y que constituye del 0,1 al 2% de las inmunoglobulinas del suero (Bovin N. V., *Biochemistry* (Moscú), 2013; 78(7): 786-797, Galili et al. *J. Exp. Med.* 1984; 160: 1519-31, y Hamadeh R. M. et al. *Clin. Diagnos. Lab. Immunol.* 1995; 2: 125-31). Los estudios han presentado datos que indican que los anticuerpos anti-Gal podrían interactuar específicamente con los epítopos de α -Gal sobre la superficie celular o los glucolípidos y glucoproteínas libres. (Galili U. et al. *J. Exp. Med.* 1985, 162: 573-82, y Galili U. *Springer Semin Immunopathol.* 1993; 15: 155-171). Se describe además que el anticuerpo anti-Gal se puede producir a lo largo de la vida como resultado de la estimulación antigénica de las bacterias de la flora digestiva (Galili U. et al. *Infect. Immun.* 1988; 56: 1730-37).

El epítipo de α -Gal se puede biosintetizar en abundancia sobre los glucolípidos y las glucoproteínas mediante la enzima de glucosilación α 1,3-galactosiltransferasa dentro del aparato de Golgi de las células de los mamíferos no primates, prosimios y en los monos del Nuevo Mundo (Galili U. et al. *Biol. Chem.* 1988; 263: 17755-62). Por el contrario, los humanos, simios y monos del Viejo Mundo carecen de los epítopos de α -Gal, pero producen el anticuerpo anti-Gal natural en enormes cantidades (Galili U. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84: 1369-73). Basándose en la secuencia del pseudogén de la α 1,3-galactosiltransferasa en los monos y de los simios, se estimó que el gen de la α 1,3-galactosiltransferasa se inactivó en los primates ancestrales del Viejo Mundo hace

aproximadamente 20 millones de años (Galili U., Swanson K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 7401-04). Se sugirió que este acontecimiento evolutivo estaba relacionado con la aparición de un agente microbiano infeccioso, endémico en el Viejo Mundo (a saber, las actuales Europa, Asia y África), lo que resultó perjudicial para los primates, y que expresaban epítomos de α -Gal. Los primates podían producir el anti-Gal como anticuerpo protector contra tal posible agente perjudicial, y solo después de que hubieran evolucionado bajo una presión selectiva para la inactivación del gen de la α 1,3-galactosiltransferasa y, así pues, la pérdida de la tolerancia inmunitaria para el epítomo de α -Gal (Galili U., Andrews P. J. *Human Evolution* 29: 433-42, 1995).

La fuerte actividad protectora del anticuerpo natural anti-Gal se ha conservado evolutivamente en los humanos y en los monos. Esto se puede deducir de los estudios de xenotrasplantes con órganos de cerdo que expresan los epítomos de α -Gal. Ya que las células de diferentes mamíferos, entre ellos los cerdos, expresan los epítomos de α -Gal, los órganos de cerdos trasplantados en los humanos o en los monos del Viejo Mundo acaban siendo rechazados debido a la fijación *in vivo* del anticuerpo anti-Gal a estos epítomos en las células de los cerdos (Galili, U. *Immunol. Today* 1993, 14: 480-82). El trasplante de los tejidos de cerdo en los humanos o en los monos del Viejo Mundo da lugar a que el anti-Gal se fije con avidez a los epítomos de α -Gal en un injerto *in vivo* y a la posterior inducción del rechazo del xenoinjerto. Los xenoinjertos vascularizados (p. ej., corazón de cerdo) experimentan un rechazo rápido (denominado rechazo hiperagudo) en los monos en menos de 30 a 60 min, principalmente como resultado de que las moléculas de los anticuerpos anti-Gal se fijan a los epítomos de α -Gal en las células endoteliales de los cerdos, se activa el complemento, se lisan las células endoteliales y se colapsa el lecho vascular (Collins B. H. et al. *J. Immunol.* 1995; 154: 5500-10). Además, la mayor parte de la destrucción de las células del xenoinjerto en las áreas extravasculares está mediada por la fijación del anti-Gal de tipo IgG a los epítomos de α -Gal en diferentes células. Esta fijación da lugar a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), después de la fijación de la porción Fc del anti-Gal de tipo IgG a los receptores de Fc γ fijados en la célula sobre los granulocitos, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales.

La destrucción de los xenoinjertos dependiente de anti-Gal podía seguirse con cartílago de cerdo (un tejido de xenoinjerto sin vascularizar) trasplantado en los monos rhesus (a saber, monos que producen de forma natural los anticuerpos anti-Gal). Los estudios indican que la fijación de anti-Gal a los epítomos de α -Gal en el tejido de cerdo da lugar a la inducción de una reacción inflamatoria extensa que conduce a la destrucción gradual del tejido en menos de 2 meses (Stone K. R. et al. *Transplantation* 1998, 65: 1577-83). La fijación del anti-Gal a los epítomos de α -Gal sobre las glucoproteínas de la matriz celular y extracelular del cartílago los opsoniza adicionalmente (a saber, forma complejos inmunitarios con ellos) y, así pues, los dirige hacia las células presentadoras de antígeno mediante la fijación de la porción Fc del anti-Gal inmunocomplejado a los receptores de Fc γ sobre las células presentadoras de antígeno. Las células presentadoras de antígeno, a su vez, transportan estas glucoproteínas de cerdo hasta los ganglios linfáticos de drenaje, donde activan muchos linfocitos T específicos de numerosos xenopéptidos de cerdo. Estos linfocitos T activados migran posteriormente al interior del xenoinjerto de cartílago implantado y comprenden aproximadamente el 80% de las células mononucleares infiltrantes. Se puede inferir que esta respuesta inflamatoria depende principalmente de la interacción del anti-Gal con los epítomos α -Gal a partir de los datos del seguimiento de la respuesta inmunitaria contra el xenoinjerto de cartílago de cerdo del cual se retiraron los epítomos de α -Gal mediante un tratamiento enzimático (por ejemplo, con la α -galactosidasa recombinante). La α -galactosidasa destruye los epítomos de α -Gal de las glucoproteínas del cartílago mediante la escisión (la hidrólisis) de la unidad de α -galactosilo terminal. En ausencia de los epítomos de α -Gal sobre las glucoproteínas del cartílago de cerdo, no hay ninguna fijación de anti-Gal al xenoinjerto y, así pues, no se produce ningún transporte eficaz de las xenoglucoproteínas mediado por las células presentadoras de antígeno. Esto se indica por una ausencia significativa de infiltración de linfocitos T en un xenoinjerto.

La presente invención contempla la explotación del potencial inmunitario del anticuerpo anti-Gal natural, demostrada por el rechazo del xenoinjerto de cartílago de cerdo, para la regresión y/o destrucción de las lesiones tumorales, tratadas para exponer los epítomos de α -Gal y para que el anticuerpo anti-Gal dirija de manera selectiva las membranas de las células tumorales hacia las células presentadoras de antígeno. Se cree que tal tratamiento convertirá las lesiones tumorales en vacunas tumorales autólogas *in situ* que desencadenan una respuesta inmunitaria protectora sistémica contra las células tumorales metastásicas mediante mecanismos similares a los observados en el rechazo del cartílago de cerdo en los monos. Se cree además que las moléculas de anti-Gal de tipo IgG que se fijan a las células tumorales que expresan los epítomos de α -Gal dirigirán selectivamente las membranas celulares tumorales hacia las células presentadoras de antígeno para desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral protectora contra los antígenos tumorales autólogos que se expresan sobre las células tumorales de la lesión tratada y también los que se expresan en las células tumorales metastásicas.

Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende el α -Gal BOEL para ser usado en el tratamiento de un tumor.

En una realización, el tumor es un tumor sólido, mieloma o un linfoma. En otra realización, el tumor es un tumor sólido. En una realización alternativa, el tumor es un tumor que no es sólido.

En una realización, el tumor es un tumor que se origina desde un órgano seleccionado entre peritoneo, hígado,

- 5 páncreas, pulmón, vejiga urinaria, próstata, útero, cuello uterino, vagina, médula ósea, mama, piel, cerebro, ganglio linfático, cabeza y cuello, estómago, intestino, colon, riñón, testículos y ovarios. En otra realización, el tumor es un tumor que se origina desde un órgano seleccionado entre peritoneo, hígado, páncreas, pulmón, vejiga urinaria, próstata, útero, cuello uterino, vagina, mama, piel, cerebro, ganglio linfático, cabeza y cuello, estómago, intestino, colon, y ovarios.
- En una realización, el tumor comprende un tumor primario y/o una metástasis. En otra realización, el tumor comprende un tumor primario. En una realización alternativa, el tumor comprende un tumor secundario.
- En una realización, el tumor comprende células de melanoma, sarcoma, glioma o carcinoma. En otra realización, el tumor comprende células de melanoma o carcinoma, o una metástasis.
- 10 La composición se puede preparar como una preparación glucolípidica acuosa que comprende el α -Gal BOEL, en donde dicha preparación comprende micelas de glucolípidos.
- 15 En una realización, la composición comprende adicionalmente uno o varios vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. El vehículo, diluyente y/o excipiente debe ser «farmacéuticamente aceptable» en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no resultar perjudicial para el destinatario de los mismos. El experto en la técnica apreciará los aspectos de la formulación farmacéutica que se ejemplifican, por ejemplo, en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*; Pharmaceutical Press; 22.^a edición; Allen, Loyd V. Ed. 2012, Londres, Reino Unido.
- 20 La composición de la invención se puede preparar mediante la combinación del α -Gal BOEL con vehículos o diluyentes farmacéuticos estándares de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica. Estos procedimientos pueden implicar la mezcla, granulación y compresión o disolución de los ingredientes como resulte más apropiado para la preparación deseada.
- En una realización, la composición farmacéutica puede también contener desoxicolato u otros detergentes suaves que podrían incrementar la penetración de los glucolípidos en las membranas celulares.
- 25 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para la administración por cualquier vía, e incluye las que están en una forma adaptada para la administración oral, tópica o parenteral a los mamíferos, incluidos los humanos.
- Por lo tanto, en una realización, la composición es para la administración por inyección. En una realización alternativa, la composición es una aplicación tópica, tal como un ungüento tópico, loción tópica o solución tópica.
- 30 En una realización, la composición se administra en una dosis o en numerosas dosis, tal como en numerosas dosis. En otra realización, las numerosas dosis se administran simultáneamente (a saber, de una vez). En otra realización alternativa, las numerosas dosis se administran de manera secuencial (a saber, en dos o más veces independientes, tal como durante tratamientos independientes).
- 35 Cuando la administración es secuencial (a saber, en veces independientes), la composición se puede administrar cuando ha transcurrido el tiempo idóneo entre las administraciones, por ejemplo, 3 días, 5 días, una semana, dos semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses o 12 meses.
- Para la administración parenteral, las formas farmacéuticas unitarias líquidas se preparan con la composición y con un vehículo estéril, tal como agua. Al preparar las soluciones, la composición se puede disolver en agua para la inyección y se puede esterilizar por filtración antes de rellenar con ella un vial o ampolla idóneo y cerrarlo herméticamente.
- 40 Las composiciones pueden ser en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas para chupar, cremas o preparaciones líquidas, tales como soluciones o suspensiones orales o parenterales estériles.
- Las formulaciones tópicas de la presente invención se pueden presentar como, por ejemplo, ungüentos, cremas o lociones, ungüentos oculares y colirios o gotas óticas, vendajes impregnados y aerosoles, y pueden contener los aditivos convencionales adecuados, tales como conservantes y emolientes en ungüentos y cremas.
- 45 Las formulaciones también pueden contener vehículos convencionales compatibles, tales como bases de cremas o de ungüentos y etanol o alcohol oleílico para lociones.
- Combinaciones**
- Se apreciará que el compuesto de la invención se puede administrar como el agente terapéutico único o se puede administrar en politerapia con uno o varios compuestos (o tratamientos) más para el tratamiento de un tumor.
- 50 Así pues, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende el α -Gal BOEL en combinación con uno o varios agentes terapéuticos más.

Para el tratamiento de un tumor, el compuesto de la invención se puede utilizar ventajosamente en combinación con uno o varios agentes medicinales más, más en particular, con uno o varios agentes contra el cáncer o adyuvantes (agentes complementarios para el tratamiento) para el tratamiento del cáncer.

5 Los ejemplos de otros agentes terapéuticos o tratamientos que se pueden administrar juntos (bien a la vez o en diferentes intervalos de tiempo) con los compuestos de la invención incluyen, pero sin limitarse a ellos:

- Inhibidores de la topoisomerasa I;
 - Antimetabolitos;
 - Agentes de acción selectiva sobre la tubulina;
 - Aglutinante del ADN e inhibidores de la topoisomerasa II;
 - 10 • Agentes alquilantes;
 - Anticuerpos monoclonales;
 - Antihormonas;
 - Inhibidores de la transducción de señales;
 - Inhibidores del proteasoma;
 - 15 • Metiltransferasas del ADN;
 - Citocinas y retinoides;
 - Tratamientos dirigidos de la cromatina;
 - Radioterapia; y
 - Otros agentes terapéuticos o profilácticos.
- 20 Ejemplos concretos de agentes o adyuvantes (o sales de los mismos) contra el cáncer incluyen, pero sin limitarse a ellos, cualquiera de los agentes seleccionados de los grupos (i) a (xlvii) y, optativamente, el grupo (xlviii), que vienen a continuación:
- (i) Compuestos de platino, por ejemplo, cisplatino (combinado optativamente con amifostina) y carboplatino u oxaliplatino;
- 25 (ii) Compuestos de taxano, por ejemplo, paclitaxel, partículas de paclitaxel fijadas a proteínas (Abraxane™), docetaxel, cabazitaxel o larotaxel;
- (iii) Inhibidores de la topoisomerasa I, por ejemplo, compuestos de la camptotecina, por ejemplo, camptotecina, irinotecán (CPT11), SN-38 o topotecán;
- 30 (iv) Inhibidores de la topoisomerasa II, por ejemplo, epipodofilotoxinas antitumorales o derivados de la podofilotoxina, por ejemplo, etopósido o tenipósido;
- (v) Alcaloides de vinca, por ejemplo, vinblastina, vincristina, vincristina liposómica (Onco-TCS), vinorelbina, vindesina, vinflunina o invesisir;
- (vi) Derivados de nucleósidos, por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU, optativamente en combinación con leucovorina), gemcitabina, capecitabina, tegafur, UFT, S1, cladribina, citarabina (Ara-C, arabinósido de citosina), fludarabina, clofarabina, o nelarabina;
- 35 (vii) Antimetabolitos, por ejemplo, clofarabina, aminopterina, o metotrexato, azacitidina, citarabina, floxuridina, pentostatina, tioguanina, tiopurina, 6-mercaptopurina, o hidroxiaurea (hidroxicarbamida);
- (viii) Agentes alquilantes, tales como clorometinas o nitrosourea, por ejemplo, ciclofosfamida, clorambucilo, carmustina (BCNU), bendamustina, tiotepa, melfalán, treosulfano, lomustina (CCNU), altretamina, busulfano, dacarbazina, estramustina, fotemustina, ifosfamida (optativamente en combinación con mesna), pipobromán, procarbazona, estreptozocina, temozolomida, uracilo, mecloretamina, metilciclohexilcloroetilnitrosourea o nimustina (ACNU);
- 40 (ix) Antraciclinas, antracenodionas y fármacos relacionados, por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina

- (optativamente en combinación con dexrazoxano), formulaciones liposómicas de doxorubicina (p. ej., Caelyx™, Myocet™, Doxil™), idarubicina, mitoxantrona, epirubicina, amsacrina, o valrubicina;
- 5 (x) Epotilonas, por ejemplo, ixabepilona, patupilona, BMS-310705, KOS-862 y ZK-EPO, epotilona A, epotilona B, desoxiepotilona B (también conocida como epotilona D o KOS-862), azaepotilona B (también conocida como BMS-247550), aulimalida, isolaulimalida, o lueterobina;
- (xi) Inhibidores de las metiltransferasas del ADN, por ejemplo, temozolomida, azacitidina o decitabina;
- (xii) Antifolatos, por ejemplo, metotrexato, pemetrexed o raltitrexed;
- (xiii) Antibióticos citotóxicos, por ejemplo, antinomicina D, bleomicina, mitomicina C, dactinomicina, carminomicina, daunomicina, levamisol, plicamicina o mitramicina;
- 10 (xiv) Aglutinantes de la tubulina, por ejemplo, combrestatina, colchicinas o nocodazol;
- (xv) Inhibidores de la transducción de señales, tales como inhibidores de cinasas (p. ej., inhibidores del EGFR (receptor del factor de crecimiento epitelial), inhibidores del VEGFR (receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular), inhibidores del PDGFR (receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas), MTKI (inhibidores de cinasa multidiaria), inhibidores de Raf, inhibidores de mTOR, por ejemplo, mesilato de imatinib, erlotinib, gefitinib, dasatinib, lapatinib, dovitinib, axitinib, nilotinib, vandetanib, vatalinib, pazopanib, sorafenib, sunitinib, temsirólimus, everólimus (RAD 001) o vemurafenib (PLX4032/RG7204);
- 15 (xvi) Inhibidores de la cinasa Aurora, por ejemplo, AT9283, barasertib (AZD1152), TAK-901, MK0457 (VX680), cenisertib (R-763), danusertib (PHA-739358), alisertib (MLN-8237), o MP-470;
- (xvii) Inhibidores de CDK, por ejemplo, AT7519, roscovitina, seliciclib, alvocidib (flavopiridol), dinaciclib (SCH-727965), 7-hidroxistaurosporina (UCN-01), JNJ-7706621, BMS-387032 (también conocida como SNS-032), PHA533533, PD332991, ZK-304709, o AZD-5438;
- 20 (xviii) Inhibidores de PKA/B e inhibidores de la vía de PKB (akt), por ejemplo, AT13148, AZ-5363, Semaphore, SF1126 e inhibidores de MTOR, tales como análogos de la rapamicina, AP23841 y AP23573, inhibidores de la calmodulina (inhibidores de translocación del factor *forkhead*), API-2/TCN (tricitribina), RX-0201, HCl de enzastaurina (LY317615), NL-71-101, SR-13668, PX-316, o KRX-0401 (perifosina/NSC 639966);
- 25 (xix) Inhibidores de Hsp90, por ejemplo, AT13387, herbimicina, geldanamicina (GA), 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina (17-AAG), p. ej., NSC-330507, Kos-953 y CNF-1010, hidrocloreto de 17-dimetilaminoetilamino-17-desmetoxigeldanamicina (17-DMAG), p. ej., NSC-707545 y Kos-1022, NVP-AUY922 (VER-52296), NVP-BEP800, CNF-2024 (BIIB-021, una purina oral), ganetespib (STA-9090), SNX-5422 (SC-102112) o IPI-504;
- 30 (xx) Anticuerpos monoclonales (conjugados o sin conjugar con radioisótopos, toxinas u otros agentes), derivados de anticuerpos y agentes relacionados, tales como anticuerpos anti-CD, anti-VEGFR, anti-HER2 o anti-EGFR, por ejemplo, rituximab (CD20), ofatumumab (CD20), ibritumomab tiuxetán (CD20), GA101 (CD20), tositumomab (CD20), epratuzumab (CD22), lintuzumab (CD33), gemtuzumab ozogamicina (CD33), alemtuzumab (CD52), galiximab (CD80), trastuzumab (anticuerpo contra HER2), pertuzumab (HER2), trastuzumab-DM1 (HER2), ertumaxomab (HER2 y CD3), cetuximab (EGFR), panitumumab (EGFR), necitumumab (EGFR), nimotuzumab (EGFR), bevacizumab (VEGF), ipilimumab (CTLA4), catumaxumab (EpCAM y CD3), abagovomab (CA125), farletuzumab (receptor de folato), elotuzumab (CS1), denosumab (ligando de RANK), figitumumab (IGF1R), CP751,871 (IGF1R), mapatumumab (receptor de TRAIL), metMAB (met), mitumomab (gangliósido GD3), naptumomab estafenatox (5T4) o siltuximab (IL6);
- 35 (xxi) Antagonistas de los receptores de estrógenos o moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) o inhibidores de la síntesis de estrógenos, por ejemplo, tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, droloxifeno, faslodex o raloxifeno;
- 40 (xxii) Inhibidores de la aromatasa y fármacos relacionados, tales como exemestano, anastrozol, letrozol, testolactona, aminoglutetimida, mitotano o vorozol;
- 45 (xxiii) Antiandrógenos (a saber, antagonistas del receptor de andrógenos) y agentes relacionados, por ejemplo, bicalutamida, nilutamida, flutamida, ciproterona o ketoconazol;
- (xxiv) Hormonas y análogos de las mismas, tales como medroxiprogesterona, dietilestilbestrol (también conocido como dietilestilbestrol) u octreotida;
- 50 (xxv) Esteroides, por ejemplo, propionato de dromostanolona, acetato de megestrol, nandrolona (decanoato, fenpropionato), fluoximestrona o gospipol,
- (xxvi) Inhibidor esteroideo de la citocromo P450 17 α -hidroxilasa-17,20-liasa (CYP17), p. ej., abiraterona;

- (xxvii) Agonistas o antagonistas de la gonadoliberina (GnRAs), por ejemplo, abarelix, goserrelina, histrelina, leuprorrelina, triptorrelina, buserrelina o deslorrelina;
- (xxviii) Glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, prednisolona, dexametasona;
- 5 (xxix) Agentes de diferenciación, tales como retinoides, rexinoides, vitamina D o ácido retinoico y bloqueantes del metabolismo del ácido retinoico (RAMBA), por ejemplo, acutano, alitretinoína, bexaroteno o tretinoína;
- (xxx) Inhibidores de la farnesiltransferasa, por ejemplo, tipifarnib;
- (xxxi) Terapias dirigidas sobre la cromatina, tales como inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), por ejemplo, butirato de sodio, ácido de hidroxiamida de suberoilánilida (SAHA), depsipéptido (FR 901228), dacinostat (NVP-LAQ824), R306465/JNJ-16241199, JNJ-26481585, tricoestatina A, vorinostat, clamidocina, A-173, JNJ-MGCD-0103, PXD-101 o apicidina;
- 10 (xxxii) Inhibidores del proteasoma, por ejemplo, bortezomib, carfilzomib, CEP-18770, MLN-9708 u ONX-0912;
- (xxxiii) Fármacos fotodinámicos, por ejemplo, porfímero de sodio o temoporfina;
- (xxxiv) Agentes contra el cáncer procedentes de organismos marinos, tales como trabectedina;
- 15 (xxxv) Fármacos radiomarcados para radioinmunoterapia, por ejemplo, con un isótopo emisor de partículas β (p. ej., yodo 131, itrio 90) o un isótopo emisor de partículas α (p. ej., bismuto 213 o actinio 225), por ejemplo, ibritumomab o yodo-tositumomab;
- (xxxvi) Inhibidores de la telomerasa, por ejemplo, telomestatina;
- (xxxvii) Inhibidores de la metaloproteínasa de la matriz, por ejemplo, batimastat, marimastat, prinostat o metastat;
- 20 (xxxviii) Interferones recombinantes (tales como interferón γ e interferón α) e interleucinas (p. ej., interleucina 2), por ejemplo, aldesleucina, denileucina difitox, interferón α 2a, interferón α 2b o peginterferón α 2b;
- (xxxix) Moduladores de la inmunorrespuesta selectiva, por ejemplo, talidomida o lenalidomida;
- (xl) Vacunas terapéuticas, tales como sipuleucel-T (Provenge) u OncoVex;
- (xli) Activadores de citocinas, que incluyen picibanil, romurtida, sizofirán, virulizina, o timosina;
- (xlii) Trióxido de arsénico;
- 25 (xliii) Inhibidores de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), por ejemplo, atrasentán ;
- (xliv) Enzimas tales como L-asparaginasa, pegaspargasa, rasburicasa o pegademasa;
- (xlv) Inhibidores de reparación del ADN, tales como inhibidores de PARP, por ejemplo, olaparib, velaparib, iniparib, INO-1001, AG-014699 u ONO-2231;
- 30 (xlvi) Agonistas del receptor de la muerte (p. ej., el receptor del ligando inductor de apoptosis relacionada con el TNF (TRAIL)), tal como mapatumumab (antes HGS-ETR1), conatumumab (antes AMG 655), PRO95780, lexatumumab, dulanermina, CS-1008, apomab o ligandos TRAIL recombinantes, tales como ligando de TRAIL/Apo2 humano recombinante;
- (xlvii) Agentes profilácticos (adjuntos); a saber, agentes que reducen o alivian algunos de los efectos secundarios asociados a los quimioterápicos, por ejemplo,
- 35 o antieméticos,
- o agentes que previenen o hacen durar menos la neutrocitopenia asociada a la quimioterapia, y previenen las complicaciones que surgen de la disminución del número de plaquetas, glóbulos rojos o glóbulos blancos, por ejemplo, interleucina 11 (p. ej., oprelvekina), eritropoyetina (EPO) y análogos de las mismas (p. ej., darbepoyetina α), análogos del factor estimulante de colonias, tal como el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) (p. ej., sargramostim) y factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y análogos de los mismos (p. ej., filgrastim, pegfilgrastim),
- 40 o agentes que inhiben la reabsorción ósea, tales como el denosumab o bisfosfonatos, p. ej., zoledronato, ácido zoledrónico, pamidronato e ibandronato,
- o agentes que suprimen las respuestas inflamatorias, tales como dexametasona, prednisona y prednisolona,
- 45 o agentes utilizados para reducir la concentración en la sangre de la hormona del crecimiento y del IGF-I (y

otras hormonas) en los pacientes con acromegalia u otros tumores raros productores de hormonas, tales como formas sintéticas de la hormona somatostatina, p. ej., acetato de octreotida,

- antídoto para fármacos que disminuyen la concentración de ácido fólico, tales como leucovorina o ácido folínico,
- 5 ○ agentes para el dolor, p. ej., opiatos, tales como morfina, diamorfina y fentanilo,
- antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como inhibidores de COX-2, por ejemplo, celecoxib, etoricoxib y lumiracoxib,
- agentes para la mucositis, p. ej., palifermina,
- agentes para el tratamiento de los efectos secundarios que incluyen anorexia, caquexia, edema o episodios tromboembólicos, tales como el acetato de magesrol.

En una realización concreta, la composición farmacéutica comprende además uno o varios inhibidores sistémicos de la represión del sistema inmunitario. Ejemplos de inhibidores sistémicos idóneos de la represión del sistema inmunitario se describen en el documento US 2012/263677 e incluyen los anticuerpos contra CTLA-4, PD-1 y PD-L1.

- 15 Aún en otra realización, uno o varios inhibidores sistémicos de la represión del sistema inmunitario se seleccionan de los anticuerpos anti-PD-1. Se presentan datos en la presente memoria en el ejemplo 5 y en la figura 9 que demuestran las propiedades sinérgicas de una combinación del compuesto de la invención (α -Gal BOEL) y un anticuerpo anti-PD-1 con respecto a prevenir el crecimiento de las metástasis en comparación con el α -Gal BOEL y el anti-PD-1 en monoterapia.

- 20 En otra realización, la composición farmacéutica comprende además uno o varios potenciadores de la activación del sistema inmunitario. Ejemplos de potenciadores idóneos de la activación del sistema inmunitario se describen en el documento US 2012/263677 e incluyen citocinas inespecíficas idóneas, tales como interleucina-1, -2 o -6 (IL-1, IL-2 o IL-6) y aldesleucina; interferón α o γ (IFN- α e IFN- γ), interferón α -2b e interferón pegilado (que incluye el interferón pegilado α -2a y el interferón pegilado α -2b); factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF, molgramostim o sargramostim); vacunas de células dendríticas y otras vacunas terapéuticas contra el cáncer
- 25 alógenas o autólogas, entre ellas vacunas intralesionales que contienen un virus del herpes oncolítico que codifica el GM-CSF (OncoVex®) o un plásmido que codifica un agente del antígeno B7 y de la microglobulina β -2 de leucocitos humanos diseñado para expresar antígenos alógenos con el CMH de clase I (Allovectin-7®); y anticuerpos contra antígenos tumorales específicos. Aún en otra realización, uno o varios potenciadores de la activación del sistema inmunitario se seleccionan de IL-2 y el interferón- γ .

- 30 Cada uno de los compuestos presentes en las combinaciones de la invención se pueden administrar por separado en pautas de dosis diferentes y a través de distintas vías. Por ejemplo, el α -Gal BOEL de la invención está diseñado para su administración directa al tumor, mientras que los inhibidores sistémicos de la represión del sistema inmunitario, tales como los anticuerpos anti-PD-1, típicamente se dispensarán de manera sistémica, a saber, por inyección intravenosa. Como tales, la posología de cada uno de los dos o más agentes puede diferir: cada uno se
- 35 puede administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes. El experto en la técnica conocerá debido a su conocimiento general común las pautas de dosificación y las politerapias que se pueden usar. Por ejemplo, el compuesto de la invención podría utilizarse en combinación uno o varios agentes más que se administran de acuerdo con su politerapia existente.

Métodos de tratamiento

- 40 En la presente memoria se describe un método para el tratamiento de un tumor en un sujeto, que comprende:

a) proporcionar:

- i) un sujeto que comprende al menos un tumor que comprende numerosas células cancerosas que tienen una superficie celular; y
- ii) la composición farmacéutica tal y como se define en la presente memoria; y

- 45 b) introducir la composición farmacéutica en el tumor.

En una realización, la composición farmacéutica induce una respuesta inmunitaria contra el tumor, mediante la cual se trata el tumor.

En una realización, la descripción se refiere a un método para inducir una respuesta inmunitaria contra un tumor en un sujeto, que comprende:

- 50 a) administrar a un sujeto que comprende al menos un tumor una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el α -Gal BOEL para inducir una respuesta inmunitaria contra el al menos un tumor.

En una realización, la descripción se refiere a un método para tratar un tumor en un sujeto, que comprende:

a) administrar a un sujeto que comprende al menos un tumor una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el α -Gal BOEL para inducir una respuesta inmunitaria contra el al menos un tumor,

5 en donde la inducción de una respuesta inmunitaria contra el tumor da lugar a la reducción del tumor, con lo cual se trata el tumor en el sujeto.

En una realización, la composición comprende además al menos un inhibidor sistémico de la represión del sistema inmunitario.

En una realización, el al menos un inhibidor sistémico de la represión del sistema inmunitario se selecciona de los anticuerpos contra CTLA-4, PD-1 y PD-L1.

10 En una realización, el método se repite 1-5 veces hasta que se reduce el tamaño del tumor.

En una realización, el método se repite 1- 5 veces hasta que el tumor es indetectable.

En una realización, la composición farmacéutica se inyecta en un tumor primario e induce una respuesta inmunitaria que es eficaz para el tratamiento de al menos un tumor secundario que surge del tumor primario.

15 En una realización, la composición farmacéutica se inyecta en un tumor primario e induce una respuesta inmunitaria que es eficaz a la hora de reducir el tamaño de al menos un tumor secundario que surge del tumor primario.

En una realización, el método comprende además la retirada quirúrgica del tumor después de inducir una respuesta inmunitaria contra el tumor.

En una realización, el método comprende además la retirada quirúrgica del tumor después de la administración de la composición farmacéutica.

20 En una realización, la retirada quirúrgica del tumor se produce aproximadamente entre 1-21 días después de la administración de la composición farmacéutica.

En una realización, la retirada quirúrgica del tumor se produce aproximadamente entre 1-14 días después de la administración de la composición farmacéutica.

25 En una realización, la retirada quirúrgica del tumor se produce aproximadamente entre 1-7 días después de la administración de la composición farmacéutica.

En una realización, la retirada quirúrgica del tumor se produce aproximadamente entre 7-14 días después de la administración de la composición farmacéutica.

En una realización, la retirada quirúrgica del tumor se produce aproximadamente entre 14-21 días después de la administración de la composición farmacéutica.

30 El método de la invención permite administrar el α -Gal BOEL para exponer un epítipo de α -Gal sobre la superficie celular de las células cancerosas.

En una realización, el método comprende además la exposición de un epítipo de α -Gal fijado a la membrana en dicha célula tumoral.

En una realización, la presente descripción se refiere a un método para tratar un sujeto, que comprende:

35 a) proporcionar:

i) un sujeto que tiene el anticuerpo anti-Gal endógeno y numerosos tumores no extirpables, en donde al menos un subconjunto de dichos tumores es accesible mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en inyección directa, inyección por endoscopia, broncoscopia, quistoscopia, colonoscopia, laparoscopia y cateterismo,

40 ii) la composición farmacéutica tal y como se define en la presente memoria; y

b) inyectar por vía intratumoral dicha composición mediante el uso de dicho procedimiento.

En una realización, el epítipo de α -Gal del α -Gal BOEL se vuelve opsonizado. En una realización, el epítipo de α -Gal opsonizado induce la producción de una vacuna autóloga contra dicho tumor mediante el envío de las células tumorales y las membranas celulares hacia las células presentadoras de antígeno.

45 En una realización, el sujeto es un humano o un ratón. En una realización, el sujeto es un humano. En una realización alternativa, el sujeto es un ratón.

De acuerdo con otro aspecto, la descripción se refiere a un método para introducir el α -Gal BOEL en un tumor de ratón, que comprende:

a) proporcionar:

- 5 i) un ratón, (1) que carece de un gen de la α 1,3-galactosiltransferasa, (2) que tiene anticuerpos anti-Gal, y (3) que comprende al menos un tumor que comprende numerosas células cancerosas que tienen una superficie celular; y
- ii) α -Gal BOEL; y

b) introducir el α -Gal BOEL en al menos uno de dichos tumores para exponer un epítipo de α -Gal sobre la superficie celular de las células cancerosas.

10 **Cómo dirige el anti-Gal de las vacunas tumorales autólogas hacia las células presentadoras de antígeno**

Se ha demostrado que los epítipos de α -Gal se pueden insertar *in vitro* en la membrana de una célula tumoral mediante la incubación de las células tumorales con los glucolípidos de α -Gal. La coincubación de las células tumorales o de las membranas de las células tumorales con tales glucolípidos con α -Gal da lugar a su inserción espontánea *in vitro* en las membranas de las células tumorales y la expresión de los epítipos de α -Gal en estas membranas celulares. Se estudiaron a modo de vacunas tumorales autólogas las células tumorales manipuladas genéticamente para que expresen los epítipos de α -Gal mediante diferentes métodos de biología molecular con el gen de la α 1,3-galactosiltransferasa. Después de su inyección intradérmica, el anticuerpo natural anti-Gal de tipo IgG se fija *in situ*, en el sitio de vacunación, a los epítipos de α -Gal sobre la membrana de las células tumorales que se vacunan y dirigen la vacuna hacia las células presentadoras de antígeno. Aunque no es necesario conocer el mecanismo de una invención, se cree que la fijación de la porción de Fc del anti-Gal complejoado a los receptores de Fcy sobre las células presentadoras de antígeno induce a las células presentadoras de antígeno a captar con eficacia las membranas opsonizadas de las células tumorales vacunantes. Así pues, los antígenos tumorales sin caracterizar del tumor autólogo se internalizan en las células presentadoras de antígeno. Después del transporte de las membranas de los tumores autólogos vacunantes hasta los ganglios linfáticos de drenaje, las células presentadoras de antígeno procesan y presentan los péptidos del antígeno tumoral para la activación de los linfocitos citotóxicos específicos tumorales y los linfocitos T cooperadores (a saber, linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente).

Una demostración preliminar de la eficacia de las vacunas tumorales que expresan los epítipos de α -Gal se consiguió en los estudios con un modelo experimental de ratón inmunizado con células de melanoma que expresan los epítipos de α -Gal y la prueba de provocación con las mismas células de melanoma que, sin embargo, carecen de epítipos de α -Gal (LaTemple D. C. et al. *Cancer Res.* 1999, 59: 3417-23, y Deriy L. et al. *Cancer Gene Therapy* 2005; 12: 528-39). Los ratones utilizados en estos estudios eran ratones genosuprimidos para el gen de la α 1,3-galactosiltransferasa (a saber, estos ratones carecen del epítipo de α -Gal y pueden producir el anticuerpo anti-Gal). Los ratones inmunizados con células de melanoma manipuladas genéticamente para que expresen los epítipos de α -Gal despliegan una protección inmunitaria eficaz contra la prueba de provocación con las mismas células tumorales, que sin embargo carecen de epítipos de α -Gal. En cambio, los ratones inmunizados con células tumorales que carecen de los epítipos de α -Gal no presentaban una respuesta inmunitaria protectora contra la prueba de provocación con las células tumorales vivas que carecen de los epítipos de α -Gal.

35 **Glucolípidos con α -Gal en el tratamiento del tumor**

40 La presente invención contempla el tratamiento de pacientes con masas de tumores sólidos. En las realizaciones concretas de la presente invención se contemplan nuevos tratamientos de inmunoterapia de pacientes con cáncer que persiguen inmunizar a cada paciente contra sus lesiones tumorales mediante la conversión del propio tumor del paciente en una vacuna tumoral autóloga (véase la patente de los EE. UU. n.º 5879675). Por ejemplo, la patente '675 da a conocer un procedimiento *in vitro* de células tumorales y/o membranas celulares. Tras la inyección de las células en un paciente, el anticuerpo anti-Gal dirige la vacuna hacia las CPA y desencadena una respuesta inmunitaria protectora contra un antígeno tumoral autólogo. A diferencia de la presente invención, sin embargo, la patente '675 no da conocer: i) un tratamiento intratumoral *in vivo* para la inducción de la inflamación, regresión y/o destrucción del tumor mediante el anticuerpo anti-Gal natural; ni ii) la exposición de los epítipos de α -Gal en las células tumorales *in vivo* después de una inyección intratumoral de los glucolípidos con α -Gal en los pacientes con

50 cáncer.

En una realización de la presente invención, los glucolípidos con α -Gal se pueden introducir en una lesión tumoral que comprende células tumorales mediante una inyección intratumoral no quirúrgica (a saber, por ejemplo, mediante endoscopia, cateterismo o similares) o mediante cualquier otro método para la introducción *in vivo* de los glucolípidos con α -Gal en los tumores, o los epítipos de fijación a anti-Gal en diferentes moléculas.

55 Se cree que la recidiva posquirúrgica de las metástasis que no responden a la quimioterapia son la causa más frecuente de muerte de pacientes con tumores sólidos. Se ha descrito una elevada incidencia de tales metástasis recidivantes (80%) en los pacientes con carcinoma pancreático y carcinoma de ovario, y en menor grado en otros

tumores sólidos, tales como el melanoma y el carcinoma colorrectal, de pulmón y de mama. Muchos de estos pacientes con recidivas se considera que tienen una enfermedad terminal, ya que no hay ningún tratamiento disponible para ellos y mueren al cabo de semanas o meses de la detección de las metástasis.

5 En una realización, la presente invención contempla un método terapéutico para la regresión y/o destrucción de las metástasis tumorales mediante la explotación del hecho de que todos los humanos producen de forma natural el anticuerpo anti-Gal como un aproximadamente 1% de sus inmunoglobulinas. El potencial inmunitario del anticuerpo anti-Gal se puede explotar para hacer remitir y/o destruir cualquier lesión tumoral y convertirla en una vacuna tumoral autóloga *in situ* mediante la inyección intratumoral de glucolípidos que transportan el epítipo de α -Gal (a saber, el α -Gal BOEL).

10 Por lo tanto, la invención descrita en la presente memoria puede inducir la remisión y/o destrucción de las lesiones tumorales tratadas. Así pues, en una realización, el tumor tratado experimenta una regresión. En una realización alternativa, se destruye el tumor tratado.

15 En otra realización, el tumor (a saber, el que expone el epítipo de α -Gal) experimenta una regresión, en donde dicho tumor se selecciona entre un melanoma o una metástasis en un órgano, tal como la metástasis hepática. En otra realización alternativa, se destruye el tumor (a saber, el que expone el epítipo de α -Gal), en donde dicho tumor se selecciona de un melanoma o una metástasis en un órgano, tal como la metástasis hepática.

En una realización, la etapa de introducción ocasiona la remisión de un segundo tumor en el sujeto como resultado de la conversión del tumor tratado en una vacuna tumoral autóloga. En otra realización, dicho segundo tumor se selecciona de un melanoma o una metástasis hepática.

20 En una realización, la etapa de introducción provoca la destrucción de un segundo tumor en el sujeto. En otra realización, dicho segundo tumor se selecciona de un melanoma o una metástasis hepática.

Muchos glucolípidos con α -Gal se insertarán de forma espontánea en las membranas de las células tumorales, ya que la cola lipídica hidrófoba (a saber, lipófila) de los glucolípidos con α -Gal es una forma más estable desde el punto de vista energético cuando se incluye en la lámina externa de la bicapa lipídica de la membrana celular en comparación con un corazón micelar rodeado de agua. Con anterioridad se ha demostrado que otros tipos de glucolípidos denominados gangliósidos se insertan (incorporan) de manera espontánea en las membranas celulares (Kanda S. et al. *J Biochem.* (Tokio). 1982; 91: 1707-18 y Spiegel S. et al. *J. Cell Biol.* 1985; 100: 721-26). La inserción de los glucolípidos con α -Gal en las membranas de las células tumorales se espera que dé lugar a la exposición *de novo* de los epítipos de α -Gal sobre la superficie de la membrana celular. La expresión de los epítipos de α -Gal puede facilitar una regresión y/o la destrucción, dependiente del anticuerpo anti-Gal, de las células tumorales mediante tales mecanismos, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, la citólisis dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), y también puede conducir a la necrosis tumoral. A continuación, una membrana de células tumorales opsonizada por anti-Gal será una diana selectiva eficaz de las células presentadoras de antígeno, con lo que las lesiones tumorales tratadas se convierten en vacunas tumorales autólogas. Esta vacuna autóloga estimulará después el sistema inmunitario para que reaccione contra los antígenos tumorales, lo que da lugar a la remisión y/o destrucción adicional de las células tumorales que expresan estos antígenos en otras lesiones tumorales y/o micrometástasis del paciente tratado.

En una realización, el sujeto se trató con anterioridad para la retirada quirúrgica del tumor.

40 En una realización alternativa, el sujeto no se trató con anterioridad para retirarle el tumor por medios quirúrgicos, a saber, el método descrito en la presente memoria se puede realizar como un tratamiento neoadyuvante varias semanas antes de la extirpación del tumor primario. En una realización, una inyección intratumoral del α -Gal BOEL hace disminuir el tamaño del tumor y convierte el tumor tratado en una vacuna tumoral autóloga. Aunque tal tumor se acabe por extirpar, se cree que antes de su extirpación el tumor tratado desencadenará una respuesta inmunitaria contra las micrometástasis que exponen los mismos antígenos tumorales.

45 **Mecanismos del anticuerpo anti-Gal para la remisión y/o destrucción del tumor**

Aunque no es necesario conocer el mecanismo de una invención, se cree que la remisión y/o destrucción de la lesión tumoral mediante la inyección de glucolípidos con α -Gal puede comprender una base bioquímica y fisiológica.

En una realización, el método comprende además la inducción de una inflamación intratumoral.

50 Una inyección intratumoral puede dar lugar a la ruptura local de los capilares asociados al tumor, con lo que se proporciona el acceso de las moléculas del anticuerpo natural anti-Gal de tipo IgM y anti-Gal de tipo IgG al interior del tumor. A continuación, los anticuerpos anti-Gal serían capaces de interactuar con los epítipos de α -Gal sobre las micelas de glucolípidos con α -Gal, o con moléculas individuales de glucolípidos con α -Gal, con lo que se induce la activación local del complemento y la generación de los factores C5a y C3a quimiotácticos por la escisión del complemento. Además, C3b consigue depositarse covalentemente sobre las células destinatarias. Luego, la activación del complemento inicia un proceso inflamatorio local que facilita que granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas migren al interior del tumor dirigidas por los factores quimiotácticos C5a y C3a producidos de

5 *novo* dentro de las lesiones tumorales tratadas. El proceso inflamatorio se puede amplificar además como resultado de la inserción de los glucolípidos con α -Gal en las membranas celulares, lo que provoca que el anti-Gal active las células endoteliales (Palmetshofer A. et al. *Transplantation*. 1998; 65: 844-53; Palmetshofer A. et al. *Transplantation*. 1998; 65: 971-8). La activación de las células endoteliales y el daño global a las células tumorales puede dar lugar a la producción local de más citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Estas citocinas y quimiocinas secretadas localmente inducen la migración adicional de macrófagos, células dendríticas, y la posterior migración de linfocitos, al interior de la lesión en la que se inyectaron los glucolípidos con α -Gal. Esta migración celular es dependiente de los receptores para las citocinas y quimiocinas proinflamatorias de las células presentadoras de antígeno y de los linfocitos (Cravens P. D. y Lipsky P. E. *Immunol. Cell Biol.* 2002; 80: 497-505). Esta inducción inicial de una respuesta inflamatoria hace posible que el sistema inmunitario supere su falta general de capacidad para detectar la «naturaleza furtiva» de las lesiones tumorales en desarrollo. Esta inflamación también permite que el sistema inmunitario supere el microentorno inmunosupresor dentro de las lesiones de tumores sólidos que se induce mediante el medio de citocinas locales, y que normalmente impide que los linfocitos penetren en el interior del tumor (Malmberg K. J. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004; 53: 879-92; Lugade A. A. et al. *J. Immunol.* 2005; 174: 7516-23).

20 La destrucción de las células tumorales se produce por la fijación de anti-Gal a los glucolípidos con α -Gal insertados en las membranas celulares. Los glucolípidos con α -Gal inyectados en un tumor pueden insertarse de forma espontánea en la lámina externa de la bicapa fosfolipídica de las membranas de las células tumorales. La posterior fijación del anti-Gal de tipo IgM y/o del anti-Gal de tipo IgG a los epítomos de α -Gal en los glucolípidos con α -Gal insertados induce la remisión y/o la destrucción del tumor tratado por la vía de la citólisis dependiente del complemento (CDC). La fijación de las moléculas de anti-Gal de tipo IgG a estos epítomos de α -Gal también facilita la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) de las células tumorales.

En una realización, el tumor experimenta la remisión y/o destrucción por la vía de la citólisis dependiente del complemento (CDC).

25 En una realización, el tumor experimenta la remisión y/o destrucción por la vía de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

30 En la citólisis dependiente del complemento, se cree que las moléculas de anti-Gal de tipo IgG y/o IgM que se fijan a las células tumorales que expresan los epítomos de α -Gal (debido a la inserción de los glucolípidos con α -Gal) activan el sistema del complemento. Posteriormente, se forma el complejo de ataque de la membrana C5b-9 del complemento como resultado de esta activación del complemento, a continuación «escarba» agujeros en las membranas de las células tumorales, lo que da lugar a la lisis de células tumorales. Esta citólisis dependiente del complemento se halla de igual forma cuando se lisan las células endoteliales de cerdo, lo que conduce a un rechazo hiperagudo de los xenoinjertos (Collins B. H. et al. *J. Immunol.* 1995; 154: 5500-10). En la CCDA, las células efectoras son granulocitos, macrófagos y linfocitos citotóxicos naturales. Estas células se ven atraídas a las lesiones por el proceso inflamatorio inducido por el anti-Gal. Se fijan a través de sus receptores de Fc γ (Fc γ R) a la porción Fc de las moléculas de anti-Gal de tipo IgG que se fijan a los glucolípidos con α -Gal insertados en la membrana de las células tumorales. Una vez fijadas a las células tumorales, estas células efectoras secretan sus vesículas con gránzimas en las áreas de contacto de las membranas, con lo que se generan orificios en la membrana de las células tumorales, lo que induce la destrucción de estas células tumorales. La eficacia del anti-Gal de tipo IgG para inducir la destrucción por CCDA de las células que expresan los epítomos de α -Gal se demostró con células de cerdo en xenoinjerto que se fijaban al anti-Gal a través de sus epítomos de α -Gal (Galili, U. *Immunol. Today* 1993, 14: 480-82). Un proceso similar de CCDA mediado por anti-Gal se produce cuando las células tumorales se fijan al anti-Gal a través de los epítomos de α -Gal que se expresan en la superficie de la membrana celular (Tanemura M. et al. *J. Clin. Invest.* 2000; 105: 301-10).

45 La captación de las membranas de las células tumorales por las células presentadoras de antígeno puede dar lugar a una inducción de una respuesta inmunitaria protectora contra los antígenos tumorales autólogos para hacer remitir y/o destruir las micrometástasis insensibles a la quimioterapia. El anticuerpo anti-Gal de tipo IgG fijado a los epítomos de α -Gal en los glucolípidos con α -Gal insertados en la membrana o el C3b depositado en las células destinatarias mediante la activación del complemento dependiente de anti-Gal estimula a las células presentadoras de antígeno para que internalicen las membranas celulares que expresan los antígenos tumorales (a saber, por ejemplo, antígenos asociados al tumor, los AAT). A continuación, los antígenos tumorales internalizados los pueden transportar las células presentadoras de antígeno desde la lesión tumoral tratada hasta los ganglios linfáticos de drenaje. Después, las células presentadoras de antígeno pueden procesar adicionalmente estos antígenos tumorales y presentarlos como péptidos tumorales inmunógenos que activan los linfocitos T específicos del tumor. Este procedimiento da lugar a la inducción de una respuesta inmunitaria sistémica protectora contra el tumor (a saber, por ejemplo, una vacuna tumoral autóloga). Por lo tanto, las lesiones tumorales en las que se inyectan los glucolípidos con α -Gal acaban por convertirse en vacunas tumorales autólogas *in situ* que desencadenan una respuesta inmunitaria contra las micrometástasis que expresan los antígenos tumorales como los que hay en las lesiones tumorales tratadas.

60 Como una modalidad de tratamiento clínico, los glucolípidos con α -Gal se pueden introducir en las lesiones cancerosas mediante diferentes métodos que incluyen, pero sin limitarse a ellos, una inyección intradérmica (a

saber, por ejemplo, en un tumor de melanoma); una inyección endoscópica (a saber, por ejemplo, en las metástasis colorrectales del intestino); una inyección laparoscópica (a saber, por ejemplo, en las metástasis abdominales de los carcinomas de ovario, de colon, de estómago, de hígado o de páncreas (p. ej., en el peritoneo o en el hígado)); una inyección con aguja guiada por imágenes transcutáneas (a saber, por ejemplo, en los tumores de pulmón); inyección
5 broncoscópica (a saber, por ejemplo, en los tumores de pulmón); inyección colonoscópica; o una inyección quistoscópica (a saber, por ejemplo, en los carcinomas de la vejiga urinaria).

Por lo tanto, en una realización, lo introducido comprende un procedimiento que incluye, pero sin limitarse a ellos, inyección, inyección guiada por imagen, endoscopia, broncoscopia, quistoscopia, colonoscopia, laparoscopia y cateterismo.

10 En una realización, la introducción comprende una inyección intratumoral no quirúrgica. Por ejemplo, la introducción comprende un procedimiento seleccionado entre: inyección intradérmica, inyección transcutánea guiada por imágenes, inyección endoscópica, inyección broncoscópica, inyección quistoscópica, inyección colonoscópica e inyección laparoscópica.

15 En una realización, el glucolípido con α -Gal (a saber, el α -Gal BOEL) se inyecta en una solución farmacéuticamente aceptable (a saber, una solución estéril) seleccionada del grupo que incluye, pero sin limitarse a ellas, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución fisiológica, otras soluciones acuosas u otros excipientes considerados seguros por la FDA. En una realización, la solución de los glucolípidos con α -Gal puede también contener desoxicolato u otros detergentes suaves que podrían incrementar la penetración de los glucolípidos en las membranas celulares.

20 En una realización, la presente invención contempla una inyección intratumoral de glucolípidos con α -Gal (a saber, el α -Gal BOEL) en los tumores primarios como un tratamiento neoadyuvante administrado antes de la cirugía para la extirpación del tumor. En una realización, una respuesta inflamatoria rápida inducida por la inyección prequirúrgica mediante un glucolípido con α -Gal da lugar a que disminuya el tamaño de la lesión tumoral al mismo tiempo que se convierte en una vacuna tumoral autóloga *in situ*. Aunque no es necesario conocer el mecanismo de una invención,
25 se cree que la respuesta inmunitaria contra el tumor tratado puede a la postre ayudar a inducir la destrucción inmunitaria de las micrometástasis que no son detectables en el momento de la extirpación quirúrgica de los tumores primarios. Se cree también que la administración prequirúrgica puede ayudar a impedir la recidiva de la enfermedad debido a la destrucción inmunitaria de las micrometástasis resistentes al tratamiento adyuvante convencional (a saber, por ejemplo, quimioterapia y radiación) y que expresan los mismos antígenos tumorales que expresa tumor
30 primario. Tal tratamiento neoadyuvante se puede administrar a cualquier tumor sólido o linfoma que puede recibir una inyección directa, o bien guiada con imágenes, o cualquier otro método conocido.

De acuerdo con otra descripción más, se da a conocer un kit que comprende la composición farmacéutica, tal y como se define en la presente memoria, y, optativamente, las instrucciones para utilizar dicho kit conforme al método según está definido en la presente memoria.

35 En una realización, el kit comprende adicionalmente un dispositivo de administración, tal como un dispositivo de dispensación intratumoral.

Los siguientes ejemplos pretenden ser solo ejemplos ilustrativos de las realizaciones de la invención.

Síntesis

40 En la descripción del método de síntesis que se describe a continuación y en los métodos de síntesis referenciados que se utilizan para preparar las sustancias de partida, se ha de saber que todas las condiciones de la reacción propuestas, entre ellas la elección del solvente, de la atmósfera para la reacción, de la temperatura de la reacción, de la duración del experimento y de las pruebas diagnósticas, las puede seleccionar un experto en la técnica. El experto en la técnica de síntesis orgánica sabe que la funcionalidad presente en diferentes partes de la molécula debe ser compatible con los reactantes y las condiciones que se utilizan. Las sustancias de partida necesarias se
45 pueden obtener mediante procedimientos estándares de la química orgánica, y se pueden obtener mediante procedimientos análogos a los ilustrados y/o referenciados dentro de ella.

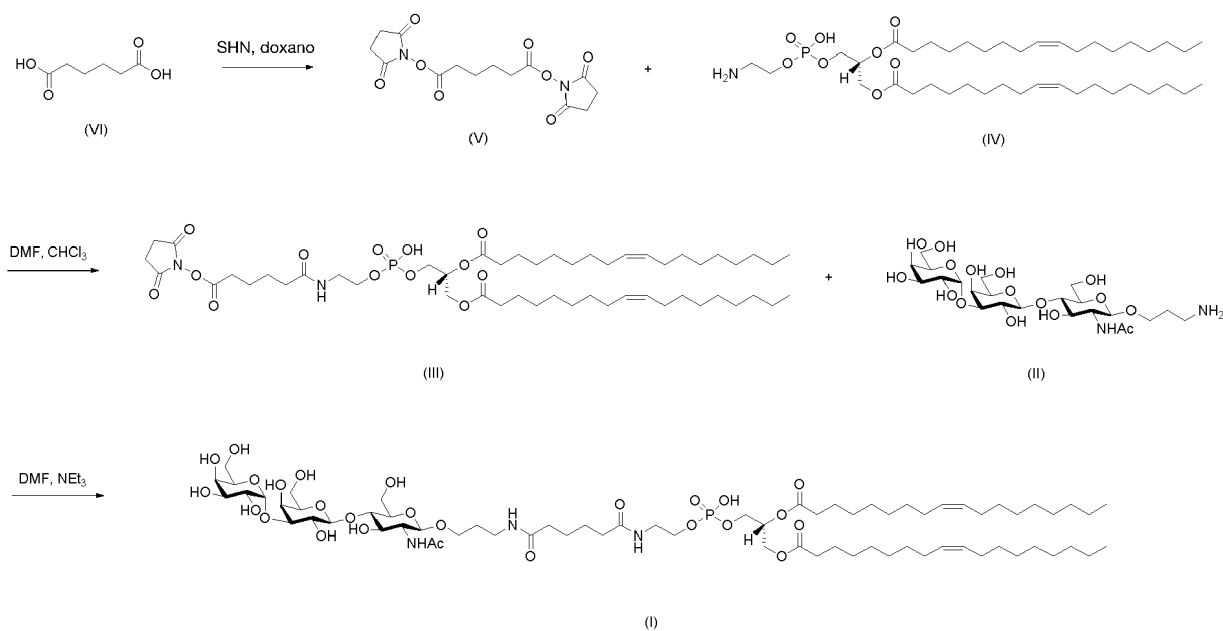
Las reacciones se realizaron con el uso de reactivos comerciales (Acros, Aldrich y Fluka); los solventes anhidros se purificaron de acuerdo con los procedimientos estándares. La cromatografía en columna se realizó en gel de sílice 60 de 0,040-0,063 mm (Merck), la filtración en gel se realizó en columnas de Sephadex LH-20 (GE Healthcare). Los
50 solventes se retiraron al vacío a 30-40 °C. Se realizó la cromatografía en capa fina (TLC, por su nombre en inglés) en placas reforzadas con aluminio F₂₅₄ de gel de sílice 60 (Merck). Las manchas de los compuestos se visualizaron al sumergir una placa de TLC en la solución acuosa de H₃PO₄ (8%) y el posterior calentamiento (>150 °C).

Los espectros de ¹H RMN se grabaron con un espectrómetro Bruker BioSpin GmbH (700 MHz) a 30 °C; los desplazamientos químicos (δ , ppm) se citaron como el máximo de D₂O interno (δ 4,750), CDCl₃ (δ 7,270), o CD₃OD (δ 3,500); las constantes de acoplamiento (*J*) se midieron en Hz. Señales de la ¹H RMN. Símbolos de los restos de monosacáridos en los espectros de RMN para los sacáridos: I – β -GlcNAc (extremo reductor), II – β -Gal, III – α -Gal. Los espectros de la EM de tipo MALDI TOF se grabaron en un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF de Bruker

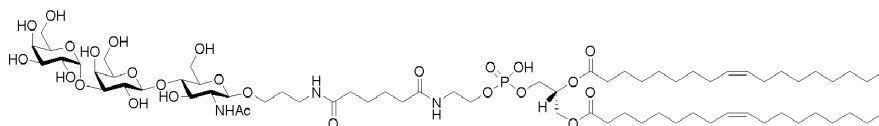
Daltonics Ultraflex (Alemania).

El método de síntesis descrito a continuación lo puede utilizar el experto en la técnica para preparar el bis(octadec-9-enoato) de (9Z,9Z)-(2R)-3-(((2-(6-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)-4-hidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)propil)amino)-6-oxohexanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo (α -Gal BOEL).

Esquema de síntesis:



Preparación del bis(octadec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-(2R)-3-(((2-(6-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)-4-hidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)propil)amino)-6-oxohexanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo.



A una solución de 3-aminopropil 4-O-[3-O-(α -D-galactopiranosil)- β -D-galactopiranosil]-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosido (II) (*Mendeleev Communications*, 2002, (143-145) o *Tetrahedron*, 61, (2005), 4313-4321, 52 mg, 0,086 mmol) en DMF seco (2 ml) se le añadieron 15 μ l de Et_3N seguido de una solución de DOPE-Ad-ONSu (III) (documento US 8,013,131 B2, 100,6 mg, 1,00 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml). La reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de una cromatografía en columna secuencial (la primera en Sephadex LH-20 y la segunda en gel de sílice que se eluye con CH_2Cl_2 -EtOH- H_2O ; 6:5:1) para dar el compuesto del título (I) (105,6 mg, 84%).

R_f 0,5 (CH_2Cl_2 -EtOH- H_2O ; 6:5:1).

^1H RMN (700 MHz, CDCl_3 - CD_3OD 1:1, 30 $^\circ\text{C}$), δ , ppm, seleccionado: 5,45-5,54 (m, 4H, 2 \times -CH=CH-), 5,34-5,43 (m, 1H, -OCH₂-CHO-CH₂O-), 5,18 (d, 1H, $J_{1,2}$ 2,52, H-1^{III}), 4,61 (d, 1H, $J_{1,2}$ 7,57, H-1^{II}), 4,60 (dd, 1H, J 2,87, J 12,00, C(O)OCHHCHOCH₂O-), 4,56 (d, 1H, $J_{1,2}$ 8,39, H-1^I), 4,36 (dd, 1H, J 6,8, J 12,00, -C(O)OCHHCHOCH₂O-), 4,19 (d, 1H, $J_{3,4}$ 2,48, H-4^{II}), 4,13-4,18 (m, 2H, -CHO-CH₂OP-), 3,52-3,62 (m, 3H, PO-CH₂-CH₂-NH, -CH₂-CHH-NH), 3,29-3,35 (m, 1H, -CH₂-CHH-NH), 2,45-2,52 (m, 4H, 2 \times -CH₂-CO), 2,36-2,45 (m, 4H, 2 \times -CH₂-CO), 2,14-2,22 (m, 11H, 2 \times (-CH₂-CH=CH-CH₂-), NHC(O)CH₃), 1,85-1,96 (m, 2H, O-CH₂CH₂CH₂-NH), 1,73-1,84 (m, 8H, COCH₂CH₂CH₂CH₂CO y 2 \times (COCH₂CH₂-), 1,36-1,55 (m, 40H, 20 CH₂), 1,05 (t, 6H, J 6,98, 2 CH₃).

$\text{C}_{70}\text{H}_{126}\text{N}_3\text{O}_{26}\text{P}$; MALDI MS: m/z 1480 (M Na+H); 1496 (MK+H); 1502 (M Na+Na), 1518 (M Na+K)

Ejemplo 1: ELISA para demostrar la fijación a los anticuerpos anti-Gal

Una placa de 96 pocillos se reviste primero con el α -Gal BOEL (obtenido de Sigma como FSL-Galili(tri)TM, n.º de catálogo F9432). Se le añaden 50 μ l de PBS a cada pocillo. El α -Gal BOEL se resuspende en PBS a una

concentración de 2 mg/ml y se añaden 50 µl a un pocillo. Se realizan diluciones seriadas mediante la transferencia de 50 µl en los pocillos por la placa asegurándose de que cada pocillo se mezcla exhaustivamente antes de la transferencia. La placa se deja secar durante una noche. Esto da lugar a una fuerte adhesión del α-Gal BOEL a los pocillos mediante la porción L (lípidos) de esta molécula.

- 5 Se añaden 150 µl del tampón de bloqueo (PBS a 1×/SAB al 1%) a los pocillos secos. Se cubre la placa y se incuba a 37 °C durante 2 horas. Se descarta el contenido de los pocillos y los pocillos se lavan con PBS. Se añaden a cada pocillo 50 µl del anticuerpo anti-Gal primario (anti-Gal de tipo IgM monoclonal de ratón en este ejemplo, sobrenadante del hibridoma M86). La placa se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas. La placa se lava 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (PBS a 1×, Tween al 0,05%).
- 10 A cada pocillo se le añaden 50 µl de la solución del anticuerpo secundario IgM-HRP antirratón de cabra (Accurate Chemical; n.º de catálogo JGM035020). Se cubre la placa y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lava 3 veces con 200 µl del tampón de lavado. A cada pocillo se le añaden 100 µl de una solución estándar (p. ej., Sigma; n.º de catálogo P8287) de ODP (dihidrocloruro de o-fenilendiamina), se incuba durante 5 min y a continuación se le añaden 50 µl de la solución de parada (ácido sulfúrico a 1 M). La absorbancia de los pocillos se lee inmediatamente a 492 nm (A_{492}) (véase la figura 2).
- 15

La figura 2 muestra el incremento de la A_{492} a medida que la cantidad de α-Gal BOEL se incrementa por la placa de ELISA. La correlación directa entre el incremento de la cantidad de α-Gal BOEL fijado a los pocillos de ELISA y el incremento de la fijación del anticuerpo anti-Gal monoclonal a estos pocillos de ELISA indica que este anticuerpo se fija a los epítomos de α-Gal de las moléculas de α-Gal BOEL secadas en los pocillos.

20 **Ejemplo 2: Citotoxicidad dependiente del complemento y ensayos de incorporación**

Los ensayos de más adelante cuantifican tanto la cantidad de α-Gal BOEL insertado en la membrana plasmática de las células como el impacto funcional que tiene la inserción de α-Gal BOEL a la hora de estimular la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por anti-Gal. Se titula el α-Gal BOEL y se incuba con las células CHO-K1. Estas células se fijan y se utilizan en un ensayo de ELISA con células completas para determinar la incorporación del α-Gal en las membranas, o bien se incuban con el anticuerpo anti-Gal y suero humano para medir la CDC (o la citotoxicidad general en ausencia del complemento del suero humano).

25

Título del α-Gal BOEL y preparación de las células CHO-K1

Se titula el α-Gal BOEL como se describe a continuación. Una alícuota de 40 µl de α-Gal BOEL (2 mg/ml (obtenido de Sigma como FSL-Galili(tri)TM, n.º de catálogo F9432)) se descongela y se trata con ultrasonidos durante 30 s. Se le añaden al tubo 40 µl de la solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se mezclan vorticialmente durante 10 s. Se añaden 25 µl de esta mezcla a 55 µl de PBS y se mezcla bien. Estas diluciones se repiten para dar una valoración completa del α-Gal BOEL en el margen de concentraciones deseado.

30

Las células CHO-K1, que carecen de epítomos de α-Gal, se resuspenden en el PBS de Dulbecco (DPBS) a 37 °C y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 min. Se aspira el sobrenadante y el sedimento de células se resuspende a 1×10^7 células/ml en 450 µl de DPBS (37 °C). El sedimento de células se lava de nuevo para retirar cualquier vestigio de suero.

35

Incubación de las células CHO-K1 con el α-Gal BOEL

Se transfiere una alícuota de la suspensión celular (45 µl) a todos los tubos de α-Gal BOEL, se mezcla con suavidad por inversión y se incuba durante 30 min a 37 °C. Las células se lavan exhaustivamente para retirar el exceso sin incorporar de α-Gal BOEL. Los tubos se centrifugan a $200 \times g$ durante 5 min y el sedimento de células se lava con 900 µl de DPBS templado, se centrifuga de nuevo a $200 \times g$ durante 5 min y se resuspende en 250 µl del medio templado. La suspensión celular (25 µl) se transfiere a una placa de ensayo (placa de 96 pocillos blanca estándar para la lectura de la luminiscencia (disponible en Corning)) para realizar el ensayo de CDC (A), o bien se transfieren 50 µl a una placa revestida de poli-d-lisina (disponible de Sigma) para el ELISA con células (B) para medir la incorporación en las membranas celulares.

40

45

Ensayo de citotoxicidad (lisis de células) celular dependiente del complemento (CDC)

Se añade (25 µl/pocillo) el anticuerpo anti-Gal (de una gama de fuentes, plasma que contiene el anti-Gal de ratón en este ejemplo) a la placa de ensayo de CDC (A) y a continuación se incuba durante 30 min a 37 °C. La placa del ensayo se incuba durante otros 30 min a 37 °C en un bloque de tubos de centrifuga calefactado. El suero humano (que contiene el complemento activo) se diluye en el medio templado (a un valor predeterminado por titulación en el ensayo) y se añaden 50 µl a cada pocillo. La placa se incuba a 37 °C durante 30 min. La placa se retira de la incubadora y se deja equilibrar hasta temperatura ambiente durante 15 min. A cada pocillo de la placa se le añaden 100 µl del reactivo CellTiterGlo (Promega, G7572). Esta luminiscencia del reactivo es proporcional a la cantidad de ATP liberado desde las células lisadas. La placa se cubre con una lámina de aluminio y se incuba en un agitador de placas (400 rpm) durante 2 min. La emisión de luminiscencia se mide con un lector de placas de 96 pocillos estándar (véase la figura 3).

50

55

La citotoxicidad general se midió siguiendo el procedimiento del ensayo de CDC de más arriba, pero reemplazando el suero humano por el medio precalentado. Se midió el nivel de muerte celular mediante la adición de 100 µl del reactivo CellTitreGlo a cada pocillo exactamente de la misma manera que para el ensayo de CDC de más arriba (véase la figura 4).

- 5 En la figura 3 se muestra la inhibición de la lisis celular dependiente del complemento con el incremento de las dosis de α-Gal BOEL. A medida que se incrementa la dosis de α-Gal BOEL, se incrementa la viabilidad celular medida por CellTitreGlo debido a que se bloquea la fijación de los componentes del complemento a las células y su lisis. Este bloqueo está mediado por la fijación de las micelas de α-Gal BOEL al anti-Gal en la solución y la activación de la cascada del complemento en la solución, lo que provoca un consumo del complemento, con lo que se inhibe que, debido al complemento, se lisen las células que expresan los epítomos de α-Gal. Si el complemento está inactivado, no se produce la muerte de las células. En ausencia de suero humano, el α-Gal BOEL no tiene impacto sobre la viabilidad de las células (figura 4) ni siquiera a 500 µg/ml. En la tabla 1 se describe el valor de CE50 (la concentración de α-Gal BOEL que da la mitad de la respuesta máxima) para la inhibición de la CDC por el α-Gal BOEL a lo largo de 4 experimentos independientes. El valor de CE50 medio es 1,35 µg/ml ±1,48. No se observa ninguna citotoxicidad ostensible ni siquiera a 500 µg/ml.

Tabla 1: Resultados del ensayo de la CDC

Experimento	Fecha analizada	CE ₅₀ (µg/ml)
1	06/02/2014	1,36
2	06/02/2014	1,24
3	19/03/2014	1,38
4	22/04/2014	1,43
	Media geométrica	1,35

ELISA con células para medir la incorporación del α-Gal BOEL en el interior de las células

- 20 Para medir la incorporación del α-Gal BOEL en el interior de las células CHO-K1, se transfieren 50 µl de la suspensión de células CHO-K1 que contienen α-Gal BOEL a una placa de 96 pocillos transparente revestida con poli-D-lisina (B). La placa se centrifuga a 1.000 rpm durante 5 min. Para fijar las células, se retira el medio y se les añaden 100 µl de formaldehído al 4% a cada pocillo. La placa se incuba en una campana de extracción de gases a temperatura ambiente durante 15 min. Se retira el formaldehído y la placa se lava dos veces con 100 µl/pocillo de la solución salina tamponada con Tris a 1× (TBS). Se utiliza un kit de ELISA con células (kit de ensayo colorimétrico In Cell ELISA, 62200 Pierce Ltd) para medir el nivel de incorporación de α-Gal BOEL.

Se retira el TBS y se les añaden 100 µl/pocillo de la solución de parada, y se incuba a temperatura ambiente durante 20 min. Se retira la solución de parada y la placa se lava una vez con 100 µl/pocillo de TBS a 1×.

- 30 Se añaden 100 µl/pocillo del tampón de bloqueo y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. Se retira el tampón de bloqueo y se le añaden 50 µl/pocillo del anticuerpo primario diluido (sobrenadante del hibridoma M86 en este ejemplo, titulado para hallar la concentración óptima). Se aplica un sellador de placas y la placa se incuba durante una noche a 4 °C. Se retira la solución del anticuerpo primario y la placa se lava 3 veces con 100 µl/pocillo del tampón de lavado a 1×.

- 35 Se le añaden 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario IgG+IgM+IgA antihumano (o antirratón) de cabra conjugado a HRP. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. La placa se lava 3 veces con 200 µl/pocillo del tampón de lavado a 1×.

Se le añaden 100 µl/pocillo del sustrato TMB a la placa incubada a temperatura ambiente, protegida de la luz. La reacción se para con la adición de 100 µl/pocillo de la solución de parada del TMB en menos de 15 min (o cuando se haya alcanzado el color azul deseado). La absorbancia a 450 nm se mide en menos de 30 min desde que se paró la reacción (véase la figura 5).

- 40 Se puede observar a partir de la figura 5 que se puede detectar α-Gal BOEL sobre la superficie de las células CHO-K1 después de la incubación, tal y como está descrito más arriba.

Ejemplo 3: Ensayos de depósito del complemento

Se recogieron 1×10^6 células B16-F10 y CHO-K1 de cultivos en crecimiento y se incubaron con 500 $\mu\text{g/ml}$ de α -Gal BOEL en PBS durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se lavaron las células 3 veces con PBS. Después del lavado, las células CHO-K1 se incubaron con suero humano normal (SHN) al 2,5% o bien inactivado con calor (SHN-IC) durante 10 min a 37 °C. Las células B16-F10 se incubaron con suero al 2,5% de ratones GT-/- normales (SRN) o bien con suero al 2,5% de ratones inmunizados con homogeneizados de riñón de cerdo (SRN-I) durante 10 min a 37 °C. Las células se colocaron en hielo y se lavaron 2 veces con el tampón de tinción de células enfriado en hielo (PBS + SAB al 0,1%). Las células se incubaron con anti-C3b (C3b, Pierce MAI-70054, diluido 1:1000 en el tampón de tinción celular) o bien anti-SC5b-9 (MAC, Quidel A239, diluido 1:100 en el tampón de tinción celular) durante 30 min en hielo. Las células se lavaron dos veces con el tampón de tinción celular enfriado en hielo y se incubaron con IgG antirratón de cabra con FITC (Abcam ab97022, diluido 1:2000 en el tampón de tinción celular) durante 30 min en hielo. Después de 2 lavados más con el tampón de tinción celular enfriado en hielo, las células se resuspendieron en el tampón de tinción celular enfriado en hielo más 7-AAD (Biolegend 420403). Las células se analizaron con un citómetro de flujo Cytomics FC500 de Beckman Coulter, y los datos se capturaron en el canal FL-1. Los datos de los histogramas presentados están sincronizados para las células vivas.

En la figura 6 se muestra que la incorporación de α -Gal BOEL conduce al depósito de las proteínas del complemento C3b y MAC desde el suero de humano o de ratón sobre la superficie de las CHO K1 (A y B) y de las células de melanoma de ratón B16 (C y D).

Ejemplo 4: Actividad *in vivo* de α -Gal BOEL en el modelo de melanoma de ratón genosuprimido para α 1,3-galactosiltransferasa (GT KO)

Se realizaron experimentos de farmacodinamia *in vivo* para valorar los efectos del α -Gal BOEL en un modelo de melanoma de ratón GT KO con las células de melanoma B16-F10. Se seleccionó la cepa de ratón GT KO porque, al igual que los humanos, no expresa el antígeno de α -Gal. Como resultado, los ratones GT KO se pueden inmunizar con homogeneizado de la membrana de riñón de cerdo para producir títulos de anticuerpos anti-Gal de tipo IgG e IgM que son similares a los vistos de forma natural en los humanos. Tal respuesta inmunitaria se induce ya que las membranas de riñón de cerdo contienen una concentración alta de epítomos de α -Gal sobre las membranas celulares y en la matriz intercelular. Se utilizaron las células B16-F10 ya que son la única célula murina conocida que no expresa los epítomos de α -Gal.

En el modelo de melanoma B16-F10, los ratones recibieron la inyección de células cultivadas B16-F10 en ambos flancos, en un flanco se le inyectaron 1×10^6 células de melanoma para crear un tumor primario y en el flanco opuesto se les inyectó un número de células reducido (1×10^4 células de melanoma) para crear un modelo de una «metástasis distante», también denominada tumor secundario. Los tumores primarios reciben una inyección intratumoral con α -Gal BOEL o el control de vehículo cuando el tumor alcanza un diámetro predefinido. El criterio de valoración crítico registrado es el crecimiento del tumor «distante»; este se utiliza para medir la capacidad que tiene un agente para desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral protectora y eficaz por todo el organismo. Se analizaron dosis de 0,1 a 2,5 mg de α -Gal BOEL. Cuando las dosis de α -Gal BOEL de 0,1 mg a 1 mg en 100 μl de vehículo se analizaron en paralelo en el modelo B16-F10, se observó una respuesta de la actividad dependiente de la dosis de α -Gal BOEL. Tal y como se ejemplifica en la figura 7, 1 mg de α -Gal BOEL confirió constantemente más protección que las dosis de 0,1 mg y 0,5 mg.

También se ha demostrado que la inmunización de los ratones GT KO con homogeneizado de membranas de riñón de cerdo induce la producción de anticuerpos anti-Gal de tipo IgG e IgM que son necesarios para conferir la protección mediada por el α -Gal BOEL del desarrollo del tumor distal en el modelo de melanoma B16-F10. Tal y como se puede observar en la figura 8, 1 mg de α -Gal BOEL protegió al 80% de los ratones GT KO productores de anti-Gal ante el desarrollo de un tumor secundario. En cambio, 1 mg de α -Gal BOEL carecía de actividad protectora en los ratones GT KO sin inmunizar (a saber, los ratones que carecen de anti-Gal). Estas observaciones indican que la inducción mediada por α -Gal BOEL de una respuesta inmunitaria antitumoral protectora contra el desarrollo de metástasis distantes es dependiente de la presencia de anti-Gal en el sujeto tratado. En ausencia de anti-Gal, no se observa ninguna respuesta inmunitaria antitumoral protectora significativa.

Ejemplo 5: La politerapia de α -Gal BOEL y el anticuerpo anti-PD-1 muestra una actividad *in vivo* superior a la de los anticuerpos anti-PD-1 en monoterapia

Varios resultados van en la línea de sugerir que dos receptores, PD-1 y CTLA-4, en los linfocitos T funcionan como puntos de control que regulan negativamente las respuestas inmunitarias antitumorales. Al mismo tiempo, los fármacos de tipo anticuerpo de tratamiento de referencia que actúan selectivamente sobre PD-1 y CTLA-4 son prometedores para el tratamiento del melanoma avanzado en los ensayos clínicos. Se comprobó si el efecto antitumoral del glucolípidio sintético α -Gal BOEL se puede potenciar en combinación con los inhibidores del punto de control inmunitario, es decir, los anticuerpos monoclonales (Acm) anti-PD-1 en el modelo de melanoma de ratón GT KO descrito más arriba. Se supone que la proliferación inicial de los linfocitos T específicos del tumor, inducidos por las células presentadoras de antígeno que presentan péptidos de antígenos tumorales procesados, se puede potenciar mediante la inhibición de puntos de control inmunitarios, tales como los anticuerpos monoclonales anti-

PD1. Así pues, se contempla que el tratamiento combinado de los sujetos portadores de tumores con α -Gal BOEL y el anticuerpo anti-PD1 será más eficaz que el de los sujetos tratados solo con uno de estos dos tratamientos.

5 Para estudiar esta suposición, los ratones se sometieron a una prueba de provocación con 10^6 células tumorales B16-F10 en un flanco para crear un tumor primario y 10^4 células B16-F10 en el flanco opuesto para inducir los tumores secundarios que simulan metástasis. Cinco días después de la inyección de las células tumorales, los tumores primarios se trataron por vía intratumoral sólo con 0,1 y 0,25 mg de α -Gal BOEL (en vez de 1,0 mg en el experimento en la figura 7) o PBS (esto es, control con vehículo). El día 8 o el día 10, los ratones se trataron por vía intraperitoneal con 250 μ g del anticuerpo monoclonal anti-PD-1 RMP1-14 (Biolegend (n.º de catálogo 114102)) o con PBS. Cabe destacar que el clon RMP1-14 se utilizó en varios estudios para explorar los efectos del anti-PD-1 en los modelos de tumor. El tratamiento con anti-PD-1 o el vehículo se repitió tres veces en cada experimento (los ratones recibieron en total cuatro dosis de 250 μ g). Tal y como se puede observar en la figura 9, una combinación de α -Gal BOEL con el anticuerpo anti-PD-1 tenía una actividad superior en términos de impedir el crecimiento de las metástasis distantes en comparación con el α -Gal BOEL y con el anti-PD-1 en monoterapia. Esto indicaba que el anti-PD-1 entra en sinergia con el α -Gal BOEL a la hora de desencadenar una respuesta inmunitaria antitumoral protectora que es más potente que la observada en los tratamientos que utilizan solo α -Gal BOEL o bien solo el anticuerpo anti-PD1.

10

15

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una composición farmacéutica que comprende el bis(octadec-9-enoato) de (9Z,9'Z)-(2R)-3-(((2-(6-((3-(((2R,3R,4R,5S,6R)-3-acetamido-5-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)-4-(((2R,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)-4-hidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-pirán-2-il)oxi)propil)amino)-6-oxohexanamido)etoxi)(hidroxi)fosforil)oxi)propano-1,2-diilo para ser usado en el tratamiento de un tumor.
- 2.** La composición para ser usada según se define en la reivindicación 1, en donde el tumor es un tumor sólido, mieloma o un linfoma.
- 10 **3.** La composición para ser usada según se define en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, en donde el tumor es un tumor que se origina desde un órgano seleccionado de peritoneo, hígado, páncreas, pulmón, vejiga urinaria, próstata, útero, cuello uterino, vagina, médula ósea, mama, piel, cerebro, ganglio linfático, cabeza y cuello, estómago, intestino, colon, riñón, testículos y ovarios.
- 4.** La composición para ser usada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tumor comprende un tumor primario y/o una metástasis.
- 15 **5.** La composición para ser usada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el tumor comprende melanoma, sarcoma, glioma o células de carcinoma.
- 6.** La composición para ser usada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es para la administración por inyección.
- 20 **7.** La composición para ser usada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se administra en una dosis o en varias dosis.
- 8.** La composición para ser usada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es una aplicación tópica, tal como un ungüento tópico, loción tópica o solución tópica.
- 9.** La composición para ser usada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que además comprende uno o varios vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 **10.** La composición para ser usada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que además comprende uno o varios agentes terapéuticos adicionales.
- 11.** La composición para ser usada según se define en la reivindicación 10, en donde uno o varios agentes terapéuticos adicionales comprenden uno o varios inhibidores sistémicos de la represión del sistema inmunitario, tal como los anticuerpos contra CTLA-4, PD-1 y PD-L1, en particular los anticuerpos anti-PD-1.

30

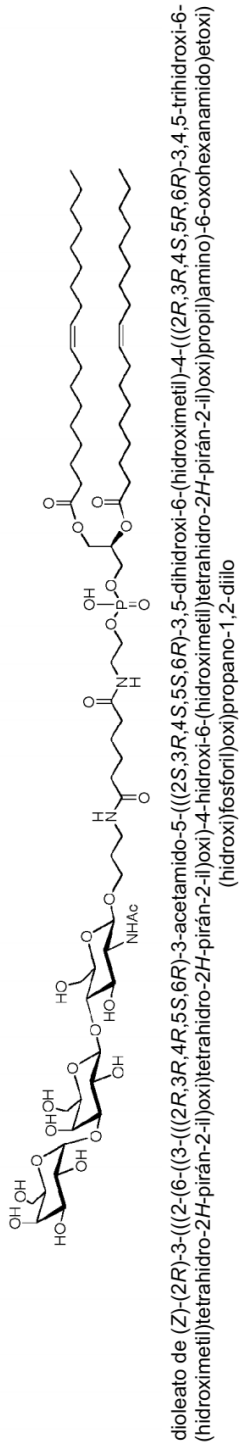


Figura 1

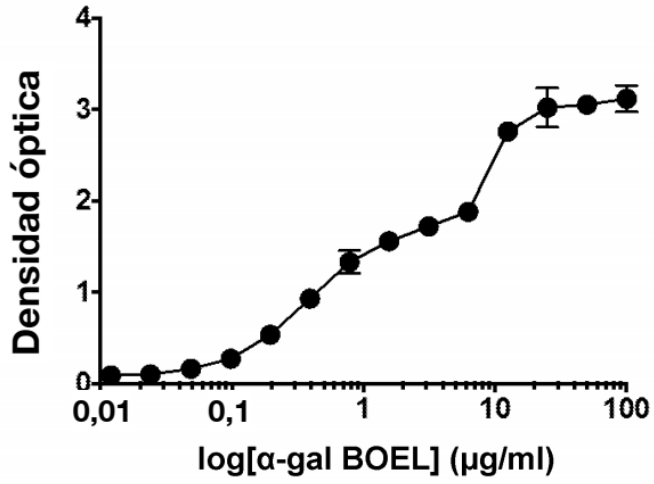


FIGURA 2

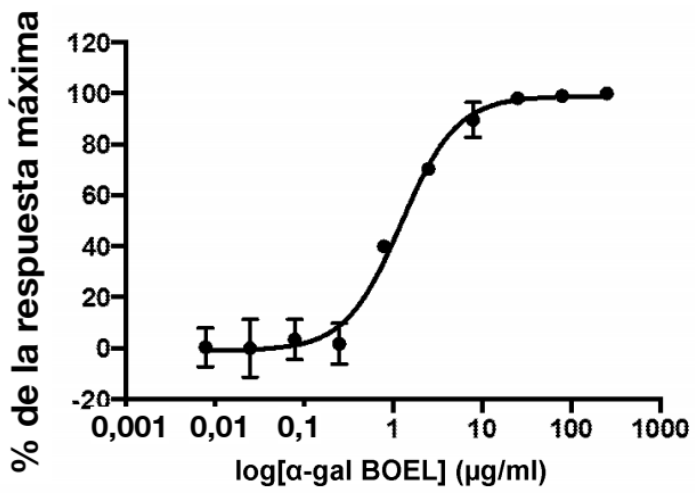


FIGURA 3

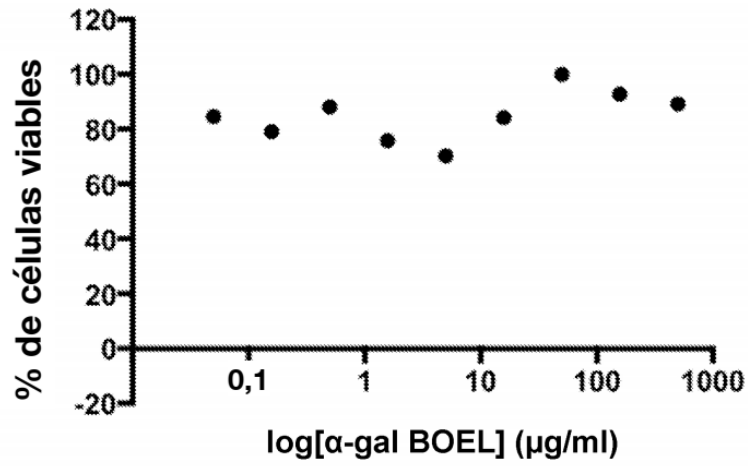


FIGURA 4

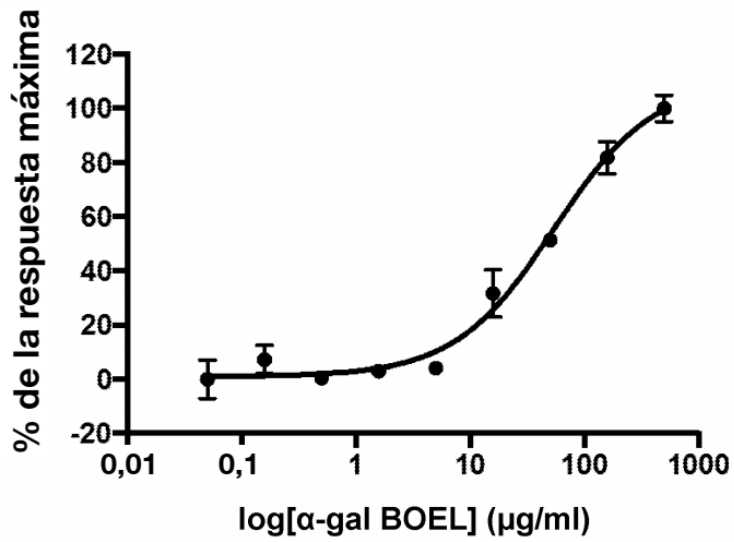


FIGURA 5

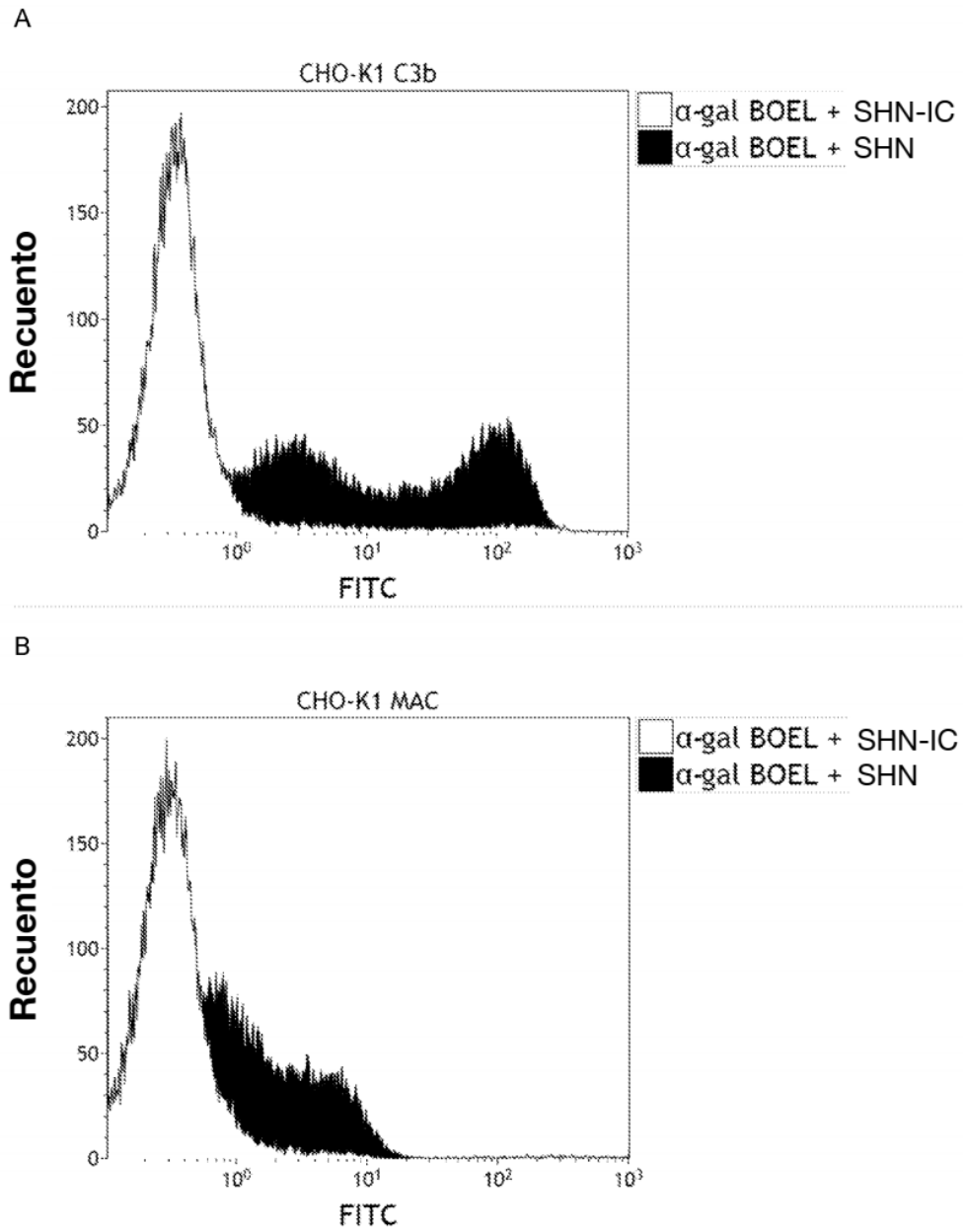
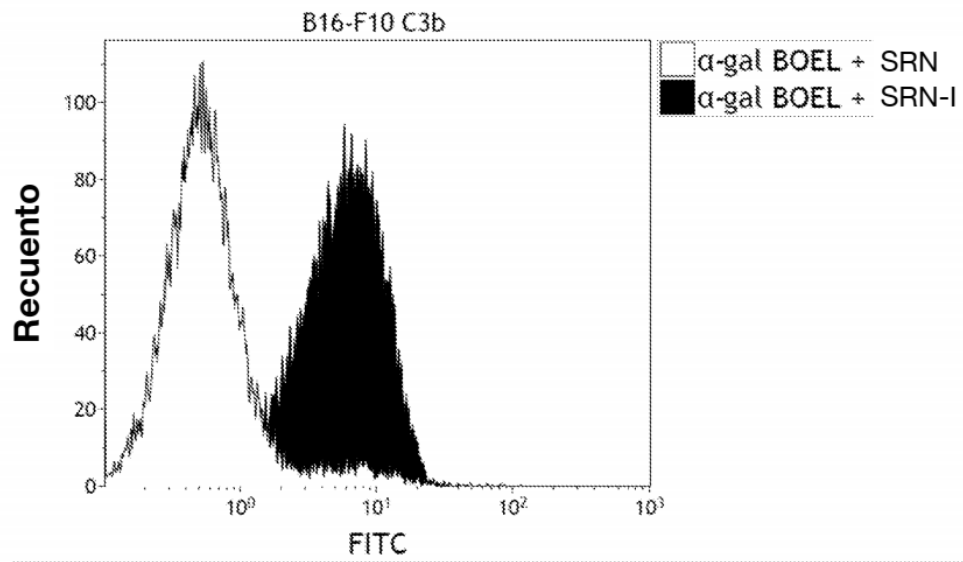


FIGURA 6

C



D

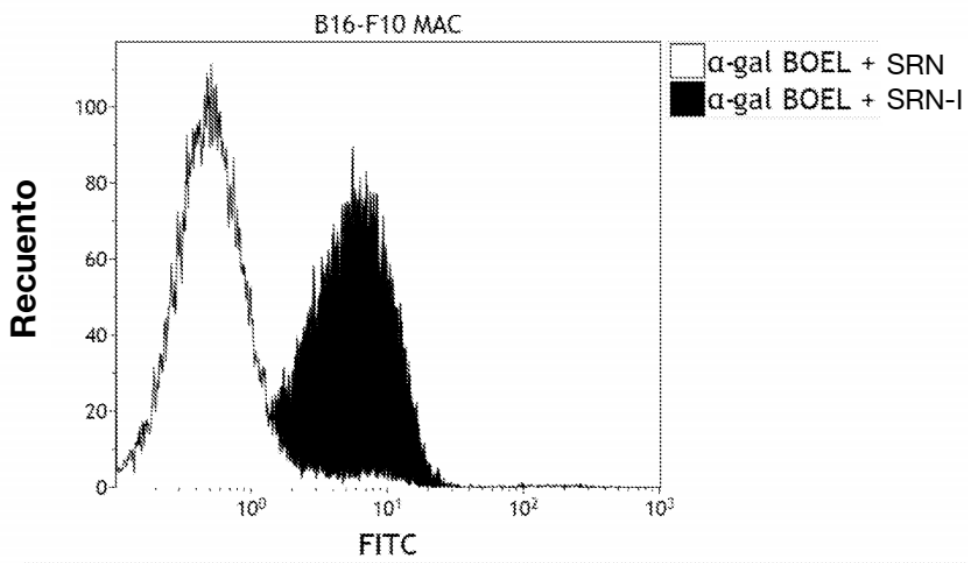
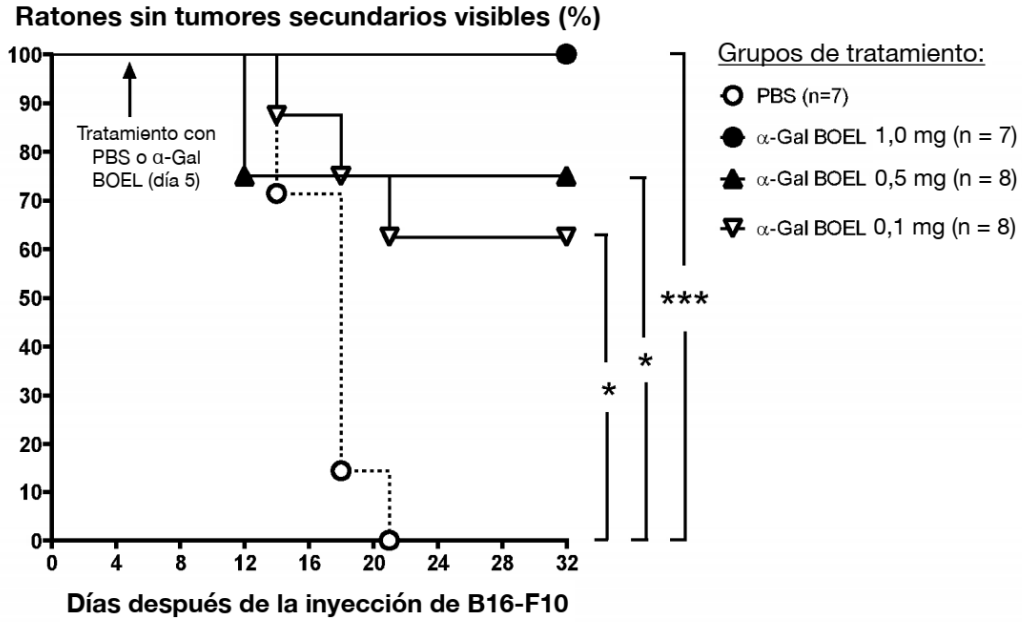


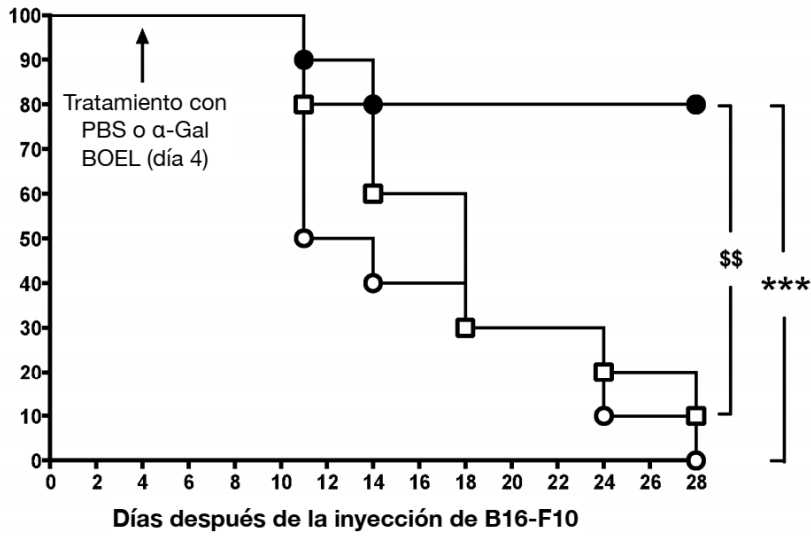
FIGURA 6 (cont.)



*, $p < 0,03$, PBS frente a 0,1 mg de α -Gal BOEL y frente a 0,5 mg de α -GAL BOEL
 ***, $p < 0,0002$, PBS frente a 1 mg de α -Gal BOEL
 Prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox)

FIGURA 7

Ratones sin tumores secundarios visibles (%)

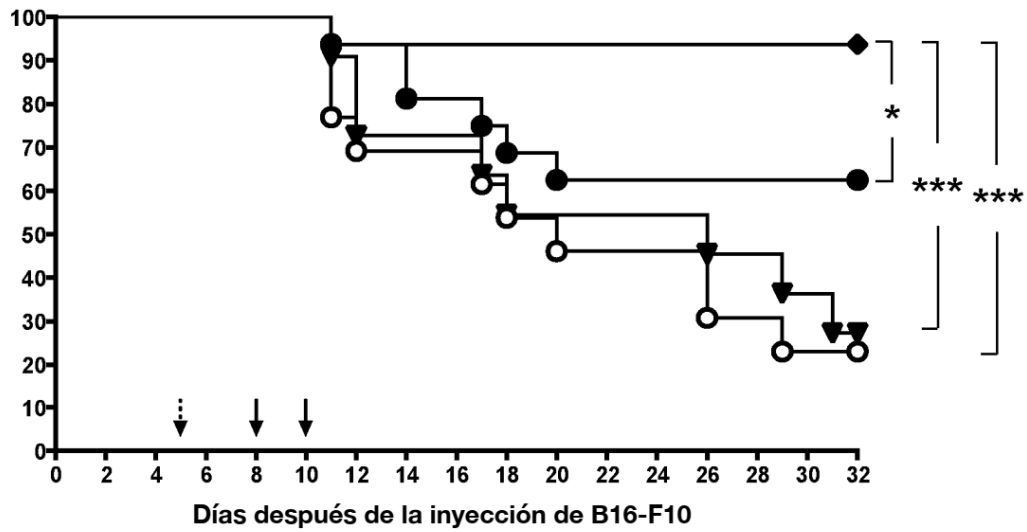


Grupos de tratamiento:

- α-Gal BOEL 1 mg; ratones hiperinmunizados (n = 10) *, p = 0,0004, hiperinmunizados con α-Gal BOEL frente a PBS
- PBS; ratones hiperinmunizados (n = 10) \$\$, p = 0,005, hiperinmunizados con α-Gal BOEL frente a no inmunizado
- α-Gal BOEL 1 mg; ratones sin inmunizar (n = 10) Prueba de rangos logarítmicos (Mantel-Cox)

FIGURA 8

Porcentaje de ratones que no desarrollaron un tumor secundario visible



Grupos de tratamiento:

○ PBS i.t.; PBS i.p. (n=13)

● α -Gal BOEL i.t.; PBS i.p. (n=16)

▼ PBS i.t.; anti-PD-1 i.p. (n=11)

◆ α -Gal BOEL i.t.; anti-PD-1 i.p. (n=16)

⋮ Tratamiento intratumoral (i.t.) con PBS o 0,1-0,25 mg de α -Gal BOEL

↓ Comienzo del tratamiento intraperitoneal (i.p.) con PBS o 250 μ g del anticuerpo anti-PD-1 (= primera de cuatro dosis)

FIGURA 9