

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 509**

51 Int. Cl.:

C07H 15/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2014** **PCT/US2014/010310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014** **WO14107652**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2014** **E 14735355 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020** **EP 2941436**

54 Título: **Vacunas con mayor densidad de antígeno carbohidratado y nuevo adyuvante de saponina**

30 Prioridad:

04.01.2013 US 201361748880 P

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

19.07.2021

73 Titular/es:

OBI PHARMA, INC. (100.0%)
Room W1907, 19F, 3 Yuan Qu Street, Nankang
Software Park
Taipei, 11503, TW

72 Inventor/es:

YU, CHENG DER TONY;
LEE, WEI, HAN;
WANG, NAN-HSUAN;
CHANG, CHUNG, HAO;
HSIEH, YIH-HUANG;
WANG, CHENG-CHI;
LIN, YU-HSIN;
LIN, YU-CHEN y
CHEN, I-JU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 843 509 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas con mayor densidad de antígeno carbohidratado y nuevo adyuvante de saponina

Antecedentes de la invención

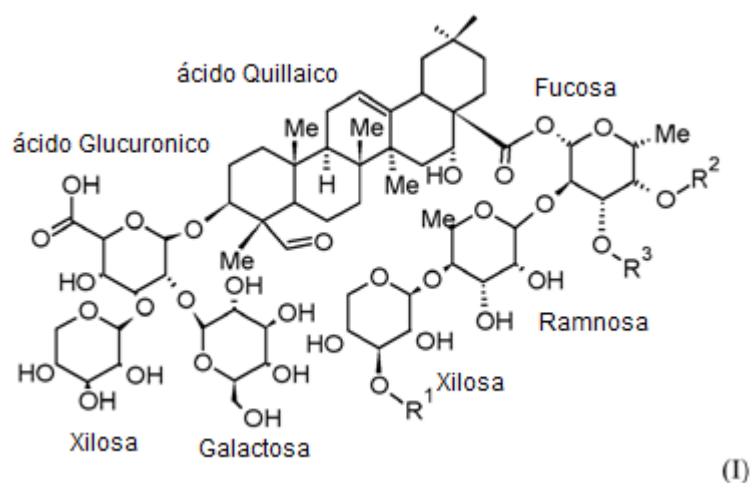
Las vacunas contra el cáncer están diseñadas para tratar el cáncer al aumentar la capacidad natural del organismo para protegerse a sí mismo, a través del sistema inmunológico. Siempre ha representado un enfoque terapéutico muy atractivo, especialmente a la luz de las muchas deficiencias de la cirugía, la radiación y las quimioterapias convencionales en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, debido a la baja inmunogenicidad del antígeno carbohidratado del cáncer y al hecho de que muchas vacunas sintéticas inducen principalmente anticuerpos IgM y, en menor medida, IgG, la eficacia de tal vacuna contra el cáncer sigue siendo baja. Se han explorado varios enfoques, tales como el uso de un adyuvante, para ayudar al reconocimiento y activación inmunitarios. Por ejemplo, el documento US2009/03174A1 enseña un nuevo adyuvante de α -galactosil-ceramida con Globo H o su fragmento para provocar la respuesta inmunitaria y el tratamiento del cáncer. El documento US2012/328646A1 describe una composición inmunogénica que contiene un glicano tal como Globo H y un fragmento inmunogénico del mismo, conjugado con una proteína portadora tal como una toxina diftérica, y un adyuvante. Sin embargo, el número de incorporación de Globo H en la toxina diftérica es 2-4.

Existe una necesidad insatisfecha de desarrollar una vacuna contra el cáncer y un adyuvante eficaz con una respuesta inmunitaria mejorada, especialmente la respuesta de IgG. La presente invención proporciona vacunas contra antígenos carbohidratados y adyuvantes para satisfacer estas y otras necesidades.

Breve compendio de la invención

En una realización, la presente invención describe una vacuna que comprende un antígeno carbohidratado asociado al tumor; y una proteína toxoide que es una toxina diftérica (DT), en donde la razón de antígeno carbohidratado asociado al tumor con respecto a proteína toxoide DT varía de 5:1 a 24:1, donde la razón representa el número de moléculas de antígeno carbohidratado asociado al tumor con respecto a proteína toxoide DR, y en donde el antígeno carbohidratado asociado al tumor se selecciona entre Globo H, antígeno embrionario específico de la etapa 3 (SEA-3) o antígeno embrionario específico de la etapa 4 (SEA-4). Se ha descubierto que la producción de IgG de la vacuna con una razón de antígeno carbohidratado con respecto a proteína toxoide que varía de 5:1 a 24:1, es mayor en comparación con la de una vacuna con una razón de antígeno carbohidratado con respecto a proteína toxoide igual o menor a 4:1.

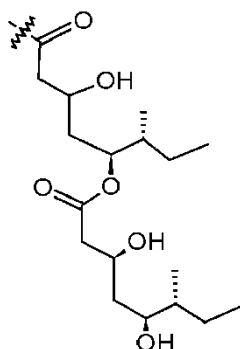
La presente descripción describe adicionalmente compuestos aislados de fórmula (I)



o una de las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos;

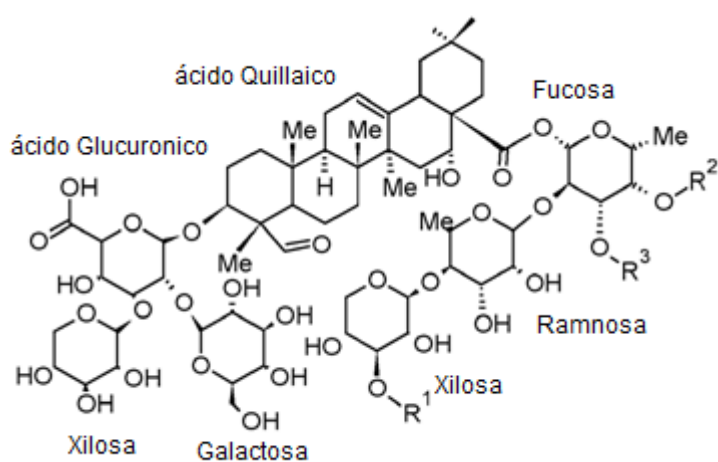
en donde

R¹ se selecciona entre β -D-Apiosa o β -D-Xilosa;



R² y R³ se seleccionan entre H, alquilo o

Se describen adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I)



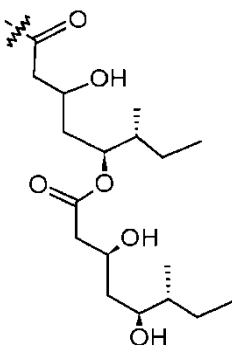
(I)

5

o una de las sales farmacéuticamente aceptables del mismo,

en donde

R¹ se selecciona entre β-D-Apiosa o β-D-Xilosa;



R² y R³ se seleccionan entre H, alquilo o

10 y un portador farmacéuticamente aceptable.

Se describe adicionalmente un adyuvante de saponina, OBI-821, que comprende el compuesto 1857 V1A, el compuesto 1857 V1B, el compuesto 1857 V2A y el compuesto 1857 V2B.

15 La presente descripción proporciona adicionalmente vacunas que comprenden un antígeno carbohidratado o su fragmento inmunogénico; y adyuvante de saponina OBI-821. En una realización, la vacuna comprende adicionalmente una proteína portadora. Se ha descubierto que las actividades de producción de IgG, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de la vacuna con adyuvante de saponina OBI-821 son mayores en comparación con la de una vacuna sin el adyuvante de saponina OBI-821.

La presente descripción describe adicionalmente métodos para (i) inhibir las células cancerosas, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la vacuna descrita en la presente memoria, en donde se inhiben las células cancerosas; e (ii) inducir una respuesta inmunitaria, que comprende administrar una cantidad eficaz de la vacuna descrita en la presente memoria a un sujeto que la necesite.

La presente invención también describe una composición farmacéutica que comprende la vacuna descrita en la presente memoria y un excipiente o portador farmacéuticamente aceptables.

La invención resultará más evidente cuando se lea con las figuras adjuntas y la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones ilustrativas de la presente invención se describen en detalle a continuación con referencia a las siguientes Figuras:

La Fig. 1A es un gráfico de barras que ilustra el título cuantitativo de IgG Anti-Globo H el Día 24 para las siguientes composiciones: Globo H/KLH/saponina OBI-821, Globo H/DT/saponina OBI-821, Globo H/DT/C34 y Globo H/KLH/C34.

La Fig. 1B es un gráfico de líneas que ilustra el título de IgG Anti-Globo H durante un período de 24 días de las composiciones de la Fig. 1A.

La Fig. 2 es un conjunto de gráficos de barras que muestran actividades ADCC y CDC *in vivo* de la vacuna G2 (Globo H/DT (8:1)); vacuna G3 (Globo H/DT (8:1)/OBI-821); y vacuna G4 (Globo H/DT (24:1)/OBI-821) en ratones durante un período de 24 días. La Fig. 2A ilustra los datos sin procesar de ADCC, la Fig. 2B ilustra los datos normalizados de ADCC, la Fig. 2C ilustra los datos sin procesar de CDC y la Fig. 2D ilustra los datos normalizados de CDC.

La Fig. 3A y la Fig. 3B son gráficos de líneas que ilustran los títulos totales de IgM e IgG de las siguientes composiciones durante un período de 24 días: G1 (Globo H/KLH/OBI-821), G2 (Globo H/DT (3:1)/OBI-821), G3 y G4 (Globo H/DT (8:1)/OBI-821), G5 (Globo H/DT (8:1)/C34), G6 (Globo H/KLH/C34), G7 (Globo H/DT (16:1)/OBI-821) y G8 (PBS).

La Fig. 4 es un conjunto de gráficos de barras que muestran la respuesta de IgM e IgG el Día 10, el Día 17 y el Día 24 de las composiciones enumeradas en la Fig. 3: el panel (A)-(C) ilustra la respuesta de IgM de las composiciones enumeradas en la Fig. 3 el día 10, 17 y 24 respectivamente. El panel (D)-(F) ilustra la respuesta de IgG de las composiciones enumeradas en la Fig. 3 el día 10, 17 y 24 respectivamente.

Fig. 5A-Fig. 5C son imágenes de espectro de masas de OBI-821 (que comprende los compuestos 1989 y 1857).

La Fig. 6 es una imagen de cromatograma LC-UV de OBI-821.

La Fig. 7 es un conjunto de imágenes de cromatograma LC-MS de OBI-821

Descripción detallada de la invención

Con el fin de proporcionar una comprensión clara y fácil de la presente invención, en la presente memoria se definen ciertos términos. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Una "cantidad eficaz", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una dosis de la vacuna o composición farmacéutica que es suficiente para reducir los síntomas y signos del cáncer, que incluyen pérdida de peso, dolor y masa tumoral, que es detectable, ya sea clínicamente como un masa palpable o radiológicamente a través de diversos medios de imagen.

El término "sujeto" se puede referir a un vertebrado que tiene cáncer ó a un vertebrado que se considera que necesita tratamiento contra el cáncer. Los sujetos incluyen animales de sangre caliente, tales como mamíferos, tales como un primate y, más preferiblemente, un ser humano. Los primates no humanos también son sujetos. El término sujeto incluye animales domesticados, tales como gatos, perros, ganado (por ejemplo, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, cabras) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratón, conejo, rata, jerbo, cobaya). Por tanto, en la presente memoria se contemplan usos veterinarios y formulaciones médicas.

Como se emplea en la presente memoria, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo monovalente lineal o ramificado que contiene, a menos que se indique lo contrario, de 1 a 20 átomos de carbono, p. ej., C₁-C₈ o C₁-C₄, que puede estar sustituido o no sustituido (otras longitudes de cadena, p. ej., 21-30, pueden estar incluidas en la invención). Los ejemplos de alquilo incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *i*-butilo y *t*-butilo.

El término "sustancialmente puro" significa sustancialmente libre de compuestos normalmente asociados con la saponina en su estado natural y que muestran una respuesta cromatográfica, perfiles de elución y actividad biológica constantes y reproducibles. No se pretende que el término "sustancialmente puro" excluya mezclas artificiales o sintéticas de la saponina con otros compuestos.

- 5 Todos los números de la presente memoria se pueden entender como modificados por "aproximadamente".

Vacunas con mayor razón de carbohidrato

Los antígenos de carbohidratos asociados a tumores generalmente muestran poca inmunogenicidad. Se ha adoptado un antígeno carbohidratado conjugado con una proteína portadora para aumentar la inmunogenicidad de dicho antígeno carbohidratado. Por ejemplo, aproximadamente 700 moléculas de Globo H se conjugan con una proteína no tóxica de hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), un promedio de aproximadamente 2 a 4 moléculas de Globo H se conjugan con la toxina diftérica (DT), aproximadamente 8 moléculas de Globo H se conjugan con albúmina de suero bovino (BSA) y aproximadamente 6 moléculas de Globo H se conjugan con el toxoide tetánico (Tabla 1 de la Patente de Estados Unidos Núm. 8.268.969).

La presente descripción proporciona una vacuna que comprende un antígeno carbohidratado o su fragmento inmunogénico; y una proteína toxoide, en donde la razón de antígeno carbohidratado con respecto a proteína toxoide varía de 5:1 a 24:1, y la razón refleja el número de moléculas de antígeno carbohidratado o su fragmento inmunogénico con respecto a moléculas de proteína toxoide. Tal vacuna muestra una mejor inmunogenicidad en comparación con una vacuna con una razón de molécula de antígeno carbohidratado con respecto a la molécula de proteína toxoide igual o inferior a 4:1. Los ejemplos de razones de número de moléculas de antígeno carbohidratado o su fragmento inmunogénico con respecto a las moléculas de proteína toxoide de acuerdo con la invención son 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 21:1, 22:1, 23:1, 24:1.

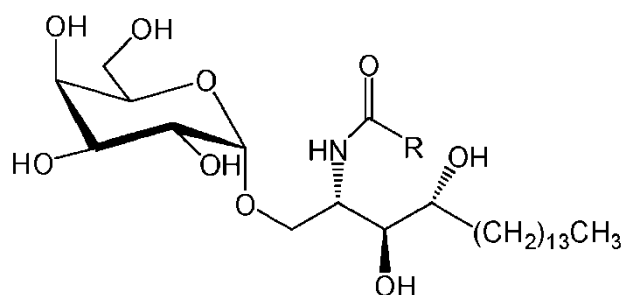
La presente descripción proporciona una vacuna que comprende un antígeno carbohidratado o su fragmento inmunogénico; y una toxina diftérica (DT), en donde la razón de antígeno carbohidratado con respecto a DT varía de 5:1 a 24:1, donde la razón refleja el número de moléculas de antígeno carbohidratado o su fragmento inmunogénico con respecto a moléculas de DT. En otra realización, la razón de antígeno carbohidratado con respecto a DT en la vacuna de carbohidrato-DT varía de 8:1 a 24:1.

Los antígenos carbohidratados incluyen Globo H, antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA3) (también llamado Gb5) y antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA-4). En una realización, el antígeno carbohidratado es Globo H. "Globo H" es un hexasacárido ($\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta 1$) que se aisló originalmente de la línea celular de cáncer de mama de ser humano MCF-7 (Menard S, Tagliabue E, Canevari S, Fossati G, Colnaghi MI. (1983) Generation of monoclonal antibodies reacting with normal and cancer cells of human breast. *Cancer Res*, 43, 1295-300; y Bremer EG, Lavery SB, Sonnino S, Ghidoni R, Canevari S, Kannagi R, Hakomori S. (1984) Characterization of a glycosphingolipid antigen defined by the monoclonal antibody MBr1 expressed in normal and neoplastic epithelial cells of human mammary gland. *J Biol Chem*, 259, 14773-7). Globo H se expresa en una variedad de tumores de células epiteliales tales como cánceres de colon, ovario, estomago, páncreas, endometrio, pulmón, próstata y mama (Menard S et al. como arriba; Bremer EG et al., como arriba; Canevari S, Fossati G, Balsari A, Sonnino S, Colnaghi MI. (1983). Globo H está disponible comercialmente (por ejemplo, Carbosynth, Reino Unido) y se puede sintetizar uniendo glicósido a ceramida utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

La vacuna con una razón de antígeno carbohidratado con respecto a proteína toxoide mayor o igual a 5:1 se fabrica en condiciones alcalinas, es decir, a un pH superior o igual a 8, superior o igual a 9, superior o igual a 10, superior o igual a 11, o superior o igual a 12. La razón de antígeno carbohidratado con respecto a proteína toxoide se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, Espectrometría de Masas MALDI-TOF. Patente de Estados Unidos Núm. U.S. 8.268.969; véase también, Morelle W, Faid V, Chirat F, Michalski JC, *Methods Mol Biol*. 2009;534:5-21. doi: 10.1007/978-1-59745-022-5_1. Analysis of N- and O-linked glycans from glycoproteins using MALDI-TOF mass spectrometry.

La vacuna puede comprender adicionalmente un adyuvante, donde el adyuvante es una saponina, tal como OBI-821, que se describe en la presente memoria o análogos sintéticos de α -galactosil-ceramida (α -GalCer o C1).

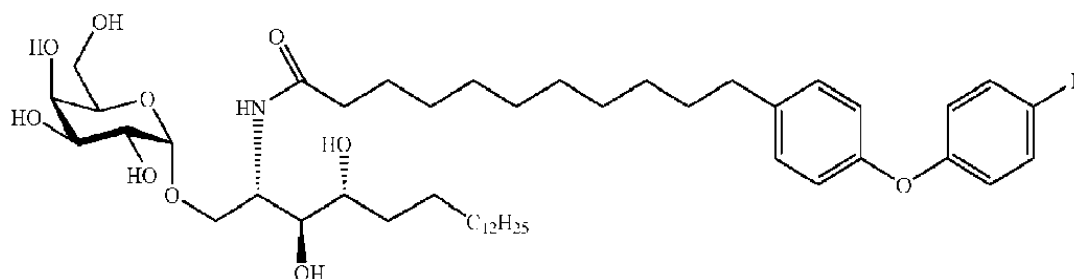
Los términos " α -galactosil-ceramida" y " α -GalCer" se refieren a un glicolípido que estimula las células T asesinas naturales para producir la citocina de células T coadyuvantes (TH)1 y TH2, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.268.969. En una realización, el adyuvante α -GalCer tiene la siguiente estructura:



en donde R es $(\text{CH}_2)_{24}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_7\text{PhF}$, $(\text{CH}_2)_{10}\text{PhOPhF}$ o $(\text{CH}_2)_{10}\text{PhF}$.

En una realización, R es $(\text{CH}_2)_{10}\text{PhOPhF}$, conocido como adyuvante C34 con la siguiente estructura:

5



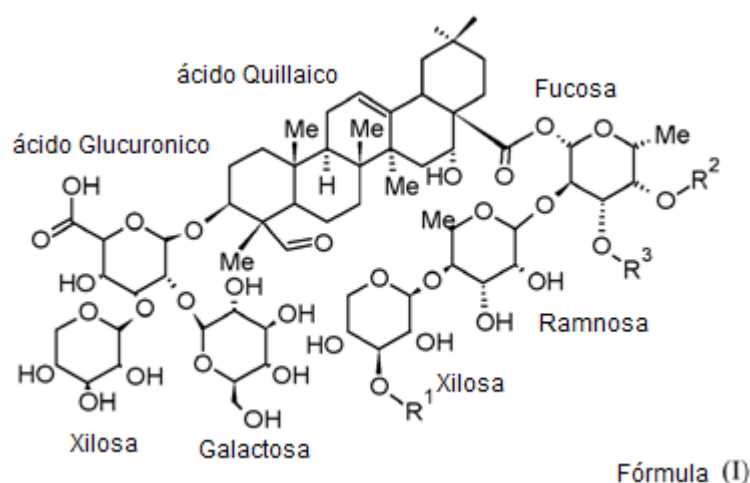
Nuevo adyuvante de saponina

La presente descripción proporciona saponinas OBI-821 que pueden ser sustancialmente puras. La descripción abarca tanto la saponina OBI-821 que es sustancialmente pura como fragmentos biológicamente activos. También se describen formas impuras de saponinas OBI-821. Las saponinas OBI-821 purificadas muestran un efecto adyuvante mejorado cuando se administran con una vacuna descrita en la presente memoria o se mezclan con otros adyuvantes de saponina o no saponina sustancialmente puros.

Las saponinas OBI-821 son glicósidos naturales, extraídos con alto grado de purificación de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina, mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), cromatografía de sílice líquida de baja presión y cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Núm. U.S. 5.057.540 y la Patente de Estados Unidos Núm. 6.524.584. El análisis de cromatografía líquida de alta presión muestra que OBI-821 es una mezcla de compuestos isoméricos relacionados estructuralmente. En la presente memoria se han identificado y descrito diferentes compuestos isoméricos purificados de saponinas OBI-821.

La saponina OBI-821 comprende al menos un compuesto aislado de fórmula I como sigue:

20

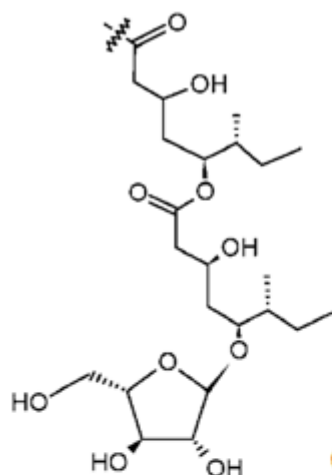


en donde

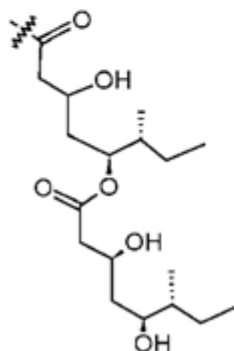
R¹ es β-D-Apiosa o β-D-Xilosa; y

R² y R³ son independientemente H, alquilo,

5



(radical acilo graso del Compuesto 1989),



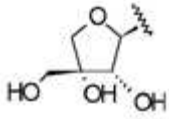
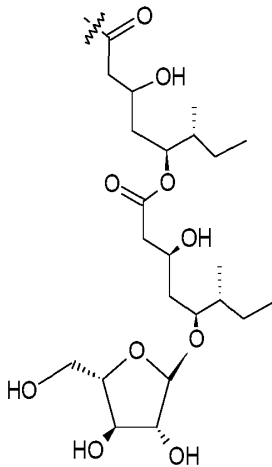
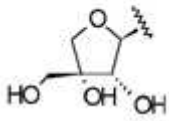
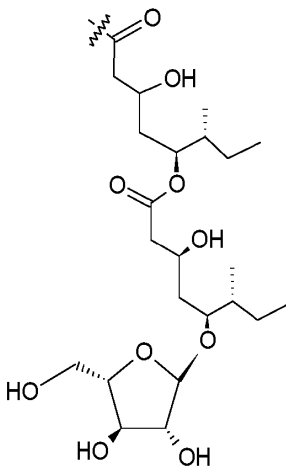
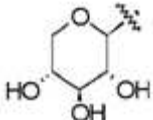
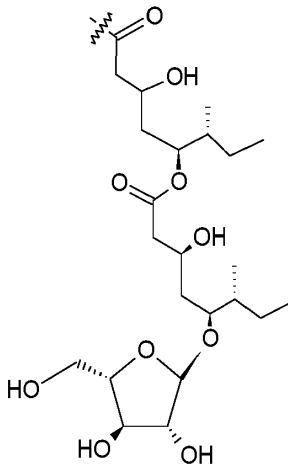
(radical acilo graso del Compuesto 1857) .

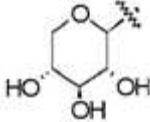
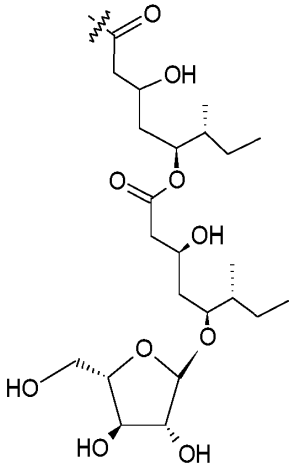
La saponina OBI-821 también puede comprender un compuesto aislado de fórmula I en donde (i) R¹ es β-D-Apiosa, R² es el radical acilo graso para el compuesto 1989 representado anteriormente, y R³ es H (compuesto 1989 V1A); (ii) R¹ es β-D-Apiosa, R² es H y R³ es el radical acilo graso radical acilo graso para el compuesto 1989 representado anteriormente (compuesto 1989 V1B); (iii) R¹ es β-D-Xilosa, R² es el radical acilo graso radical acilo graso para el compuesto 1989 representado anteriormente, y R³ es H (compuesto 1989 V2A); o (iv) R¹ es β-D- Xilosa, R² es H y R³ es el radical acilo graso radical acilo graso del compuesto 1989 representado anteriormente (compuesto 1989 V2B). En conjunto, el compuesto 1989 V1A, el compuesto 1989 V1B, el compuesto 1989 V2A y el compuesto 1989 V2B se denominan "mezcla de compuestos 1989".

La Tabla 1 resume los grupos funcionales de los compuestos 1989 y el % en moles de cada compuesto 1989 en la mezcla de compuestos 1989.

Tabla 1

% en Moles	R ¹	R ²	R ³
------------	----------------	----------------	----------------

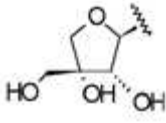
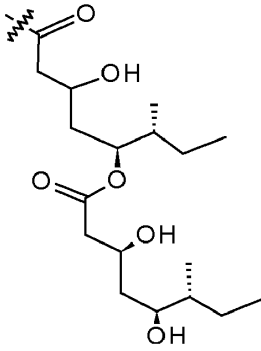
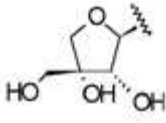
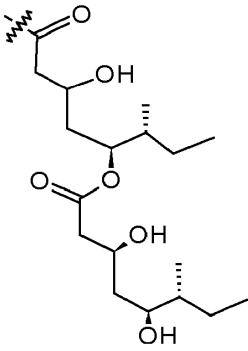
Compuesto 1989 V1A 64,5%	β-D- Apiosa 		H
Compuesto 1989 V1B 1,5%	β-D- Apiosa 	H	
Compuesto 1989 V2A 33,3%	β-D- Xilosa 		H

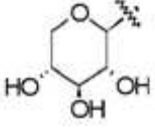
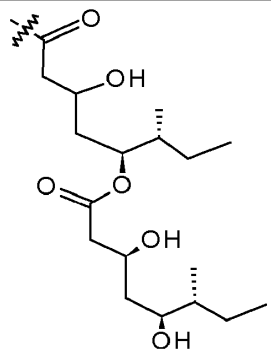
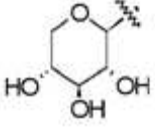
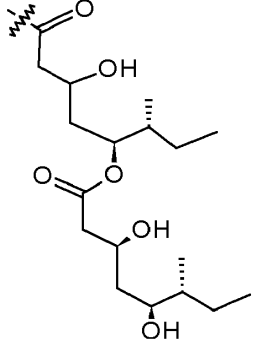
Compuesto 1989 V2B 0,7%	β-D-Xilosa 	H	
-----------------------------------	--	---	---

La saponina OBI-821 puede comprender un compuesto aislado de fórmula I donde: (i) R¹ es β -D-Apiosa, R² es el radical acilo graso para el compuesto 1857 representado anteriormente, y R³ es H (compuesto 1857 V1A); (ii) R¹ es β -D-Apiosa, R² es H y R³ es el radical acilo graso para el compuesto 1857 descrito anteriormente (compuesto 1857 V1B); (iii) R¹ es β -D-Xilosa, R² es el radical acilo graso para el compuesto 1857 representado anteriormente, y R³ es H (compuesto 1857 V2A); o, (iv) R¹ es β -D- Xilosa, R² es H y R³ es el radical acilo graso para el compuesto 1857 representado anteriormente (compuesto 1857 V2B). En conjunto, el compuesto 1857 V1A, el compuesto 1857 V1B, el compuesto 1857 V2A y el compuesto 1857 V2B se denominan "mezcla de compuestos 1857".

La Tabla 2 resume los grupos funcionales de los compuestos 1857 y el % en moles de cada compuesto 1857 en la mezcla de compuestos 1857.

Tabla 2

% en Moles	R ¹	R ²	R ³
Compuesto 1857 V1A 64,7%	β-D- Apiosa 		H
Compuesto 1857 V1B 1,3%	β-D- Apiosa 	H	

Compuesto 1857 V2A 33,4%	 β -D-Xilosa		H
Compuesto 1857 V2B 0,6%	 β -D-Xilosa	H	

La saponina OBI-821 comprende uno o más de los siguientes compuestos: (i) compuesto 1857 V1A; (ii) compuesto 1857 V1B; (iii) compuesto 1857 V2A; (iii) compuesto 1857 V2B; (iv) compuesto 1989 V1A; (v) compuesto 1989 V1B; (vi) compuesto 1989 V2A; o (vii) compuesto 1989 V2B. Los porcentajes de la mezcla de compuestos 1857 y la mezcla de compuestos 1989 en la saponina OBI-821 pueden variar de la siguiente manera:

(i) de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 15% en moles de OBI-821 que comprende una mezcla de compuestos 1857; y

(ii) de aproximadamente 85% en moles a aproximadamente 99% en moles de OBI-821 que comprende una mezcla de compuestos 1989.

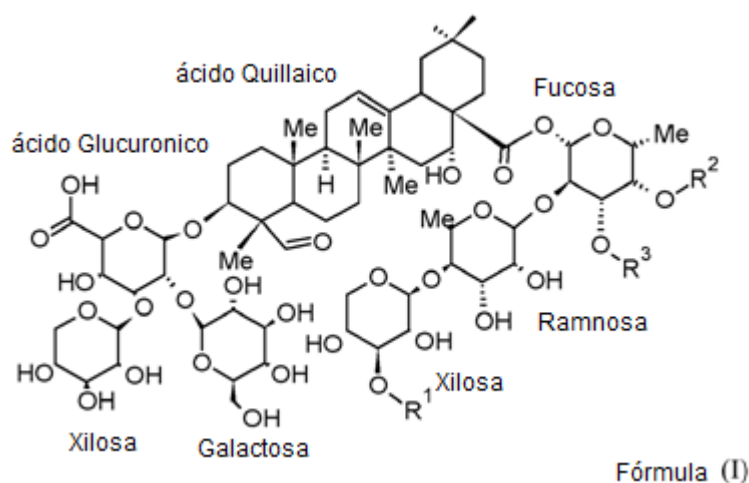
Todo él % en moles se puede variar en incrementos de 0,1% (p. ej., de aproximadamente 87% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 90,5% a aproximadamente 97%, de aproximadamente 3,5% a aproximadamente 11%, de aproximadamente 10% a aproximadamente 14%).

La mezcla de compuestos 1989 puede comprender aproximadamente 60-70% en moles del compuesto 1989 V1A; aproximadamente 1-5% en moles del compuesto 1989 V1B; aproximadamente 30-40% en moles del compuesto 1989 V2A; y aproximadamente 0,1-3% en moles del compuesto 1989 V2B. Todo él % en moles se puede variar en incrementos de 0,1 (p. ej., 65%, 2,5%, 35,6%).

La mezcla de compuestos de 1857 puede comprender aproximadamente 60-70% en moles del compuesto 1857 V1A; aproximadamente 1-5% en moles del compuesto 1857 V1B; aproximadamente 30-40% en moles del compuesto 1857 V2A; y aproximadamente 0,1-3% en moles del compuesto 1857 V2B. Todo él % en moles se puede variar en incrementos de 0,1 (p. ej., 67%, 1,5%, 33,9%).

En otra realización, el OBI-821 sustancialmente puro se purifica a partir de un extracto bruto de *Quillaja saponaria*, en donde dicho OBI-821 se caracteriza por un único pico predominante que comprende el 90% o más del área total de todos los picos de un cromatograma, excluyendo el pico de disolvente, cuando se analiza en HPLC de fase inversa en una columna Symmetry C18 que tiene un tamaño de partícula de 5 μ m, poro de 100 Å, 4,6 mm ID x 25 cm L con un programa de elución que comprende la fase móvil de A:B 95%:5% a 75%:25% en 11 minutos, cuya fase móvil A es agua destilada con ácido trifluoroacético al 0,1%, y fase móvil B es acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1% a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

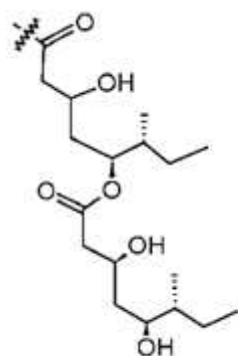
En una realización, la composición farmacéutica comprende el compuesto de fórmula (I)



en donde,

R¹ es β-D-Apiosa o β-D-Xilosa; y

5 R² y R³ son independientemente H, alquilo o



(radical acilo graso del Compuesto 1857)

y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 La vacuna puede comprender un antígeno carbohidratado o su fragmento inmunogénico y una saponina OBI-821. En otra realización, la vacuna comprende un antígeno carbohidratado seleccionado entre Globo H, SSEA-3, SSEA-4, Gb-4 o una mezcla de los mismos, una DT y una saponina OBI-821. En otra realización más, la vacuna comprende un antígeno carbohidratado o su fragmento inmunogénico; una proteína portadora y una saponina OBI-821.

Proteína Toxoide

La proteína toxoide conjugada con el antígeno carbohidratado es una toxina diftérica (DT).

Las toxinas se pueden inactivar, por ejemplo, mediante tratamiento con formaldehído, glutaraldehído, UDP-dialdehído, peróxido, oxígeno o por mutación (p. ej., utilizando métodos recombinantes). Relyveld *et al.*, *Methods in Enzymology*, 93:24, 1983. Woodrow y Levine, eds., *New Generation Vaccines*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1989. Genth *et al.*, *Inf. and Immun.*, 68 (3): 1094-1101, 2000. También se pueden producir toxinas diftéricas mutantes con toxicidad reducida utilizando métodos recombinantes. Patente de Estados Unidos Núm. 5.085.862; 5.221.618; 5.244.657; 5.332.583; 5.358.868; y 5.433.945.

DT representa materiales de reacción cruzada de toxina diftérica (DT-CRM) o toxoides diftéricos. Un DT-CRM se refiere a una toxina diftérica mutante, p. ej., por mutación o por modificación química, de manera que ya no posee suficiente ADP-ribosilo. Los ejemplos no limitantes de DT-CRM incluyen DT-CRM 30, DT-CRM 45, DT-CRM 176, DT-CRM 197 y DT-CRM 228. Un toxoide diftérico es una toxina diftérica inactivada con formaldehído. DT está disponible comercialmente o se puede preparar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como tecnología de ADN recombinante como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.614.382.

El antígeno carbohidratado de la vacuna descrita en la presente memoria se puede unir covalentemente a una proteína portadora, mediante un conector p-nitrofenilo mediante un proceso sintético descrito en la Patente de Estados Unidos Núm. 8.268.969.

Las vacunas de la presente invención pueden inducir una o más de las siguientes actividades: un título de IgG más alto en comparación con el título de IgM, una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) más alta y/o actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos más alta (ADCC). En otra realización, las vacunas inducen una o más de las siguientes células: células asesinas naturales, linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+. Se pueden medir otros parámetros inmunológicos, incluida la activación de las células T coadyuvantes.

La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende las vacunas descritas en la presente memoria y un vehículo, excipiente o portador farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. Además, el vehículo puede contener otros excipientes, tales como agentes mojantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH o adyuvantes. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden contener un compuesto fisiológicamente aceptable que actúa para, p.ej., estabilizar, aumentar o disminuir las velocidades de absorción o aclaramiento de las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, p.ej., carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, detergentes, portadores liposomales u otros estabilizadores y/o tampones. Los excipientes pueden ser tensioactivos no iónicos, polivinilpirrolidona, albúmina de suero humano, hidróxido de aluminio, agentes con acción anestésica y diversas ciclodextrinas no modificadas y derivatizadas. Más preferiblemente, los tensioactivos no iónicos pueden incluir Polisorbato 20, Polisorbato 40, Polisorbato 60 y Polisorbato 80. La polivinilpirrolidona puede ser preferiblemente Plasdone C15, una calidad farmacéutica de polivinilpirrolidona. El agente que tiene acción anestésica es preferiblemente alcohol bencílico. Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes mojantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes. Véase p.ej., la 21ª edición de Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, Pa. ("Remington's"). Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir sustancias auxiliares, tales como agentes farmacológicos, citocinas u otros modificadores de la respuesta biológica. La composición farmacéutica que comprende tal excipiente o portador se formula mediante métodos convencionales bien conocidos.

La vacuna se puede formular para la siguiente vía de administración: intramuscular, intradérmica, oral, dérmica, nasal, bucal, rectal, vaginal, por inhalación o por administración subcutánea. Pueden ser aplicables otros modos de administración siempre que se pueda inducir una inmunogenicidad satisfactoria.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, o como formas sólidas que son adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La composición farmacéutica también se puede preparar en forma sólida, emulsionada o el ingrediente activo se puede encapsular en vehículos liposómicos u otros portadores particulados utilizados para el suministro sostenido. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede estar en forma de emulsión oleosa, emulsión de agua en aceite, emulsión de agua en aceite en agua, emulsión específica del sitio, emulsión de larga residencia, emulsión adhesiva, microemulsión, nanoemulsión, liposomas, micropartículas, microesferas, nanoesferas, nanopartículas y varios polímeros naturales o sintéticos, tales como polímeros impermeables no reabsorbibles tales como copolímeros de etileno y acetato de vinilo y copolímeros Hytrel®, polímeros hinchables tales como hidrogeles o polímeros reabsorbibles tales como colágeno y ciertos poliácidos o poliésteres tales como los que se utilizan para realizar suturas reabsorbibles, que permiten una liberación sostenida de la vacuna.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente memoria y los derivados fisiológicamente funcionales de los mismos incluyen sales derivadas de una base apropiada, tal como un metal alcalino (por ejemplo, sodio, potasio), un metal alcalinotérreo (por ejemplo, calcio, magnesio), amonio y NX₄⁺ (en donde X es

alquilo C₁-C₄). Las sales farmacéuticamente aceptables de un grupo amino incluyen sales de ácidos carboxílicos orgánicos, tales como tartárico, alifático, cicloalifático, aromático, heterocíclico, carboxílico y sulfónico; clases de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido fórmico, glucurónico, málico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, mesílico, salicílico, hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, toluensulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, esteárico, algénico, hidroxibutírico, ciclohexilaminosulfónico, ácido galactárico y galacturónico, lactobiónico, fumárico y ácidos succínicos; ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos metaniesulfónico, etanosulfónico, isotiónico, bencenilesulfónico y p-toluensulfónico; y ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico, sulfámico y fosfórico. Las sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto que tiene un grupo hidroxilo consisten en el anión de dicho compuesto combinado con un catión adecuado tal como Na⁺, NH₄⁺ o NX₄⁺ (en donde X es, por ejemplo, un grupo alquilo C₁-C₄), Ca⁺⁺, Li⁺, Mg⁺⁺, o, K⁺ y zinc o sales orgánicas preparadas a partir de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas cíclicas, N,N'-dibenciletilenodiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. Todas estas sales se pueden preparar por medios convencionales a partir del compuesto correspondiente haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o la base apropiados con el compuesto en forma libre.

Métodos para Inducir la Respuesta Inmunitaria/Inhibir las Células Cancerosas

Otro aspecto de la presente descripción se dirige a métodos para inducir una respuesta inmunitaria que comprenden administrar una cantidad eficaz de la vacuna descrita en la presente memoria a un sujeto que lo necesite. La respuesta inmunitaria incluye la respuesta de las células NK, la actividad ADCC y CDC y la producción de IgM e IgG.

En otro aspecto más, la presente descripción proporciona métodos para inhibir las células cancerosas, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la vacuna descrita en la presente memoria a un sujeto que lo necesite. En una realización, el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de recto, cáncer biliar, cáncer de hígado, cáncer de boca, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de nasofaringe, cáncer de riñón/renal, tumor cerebral, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer de testículo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer oral, cáncer neuroendocrino, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer de hueso, cáncer de piel (p. ej., carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o melanoma). En otra realización, el cáncer es un cáncer que expresa Globo H. Los ejemplos no limitantes de cáncer que expresa Globo H incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de endometrio. El anticuerpo generado por la vacuna, tal como el anticuerpo anti-Globo H, inhibe inherentemente el cáncer que expresa Globo H.

En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz de una vacuna debe inducir los efectos inmunológicos deseados, tales como estimular la producción de IgG contra un antígeno carbohidratado específico (p. ej., Globo H) en un sujeto. La cantidad o dosis eficaz de una vacuna o una composición farmacéutica pueden variar dependiendo de la cantidad de antígeno carbohidratado, el tipo de adyuvante empleado, el modo de administración y la edad, tamaño y condición del sujeto a tratar. El médico determinará la cantidad exacta de vacuna o composición farmacéutica necesaria para inducir la inmunogenicidad.

La vacuna se puede administrar como una dosis convencional con o sin una o más dosis de refuerzo a intervalos de tiempo específicos, para lograr un efecto protector inmunológico a largo plazo entre varios meses y varios años. La frecuencia de administración puede variar dependiendo de una variedad de factores, p. ej., la gravedad de los síntomas, el grado de inmunoprotección deseado, si la composición farmacéutica se utiliza con fines profilácticos o curativos, etc. Por ejemplo, en una realización, la composición del producto farmacéutico de acuerdo con la invención se administra una vez al mes, dos veces al mes, tres veces al mes, cada dos semanas (qw), una vez por semana (qw), dos veces por semana (biw), tres veces por semana (tiw), cuatro veces por semana, cinco veces por semana, seis veces por semana, en días alternos (qod), diario (qd), dos veces al día (qid) o tres veces al día (tid). La vacuna también se puede administrar con otra terapia convencional tal como quimioterapia, terapia dirigida o anticuerpos dirigidos al antígeno carbohidratado asociado al tumor para el tratamiento del cáncer, ya sea de forma simultánea o secuencial.

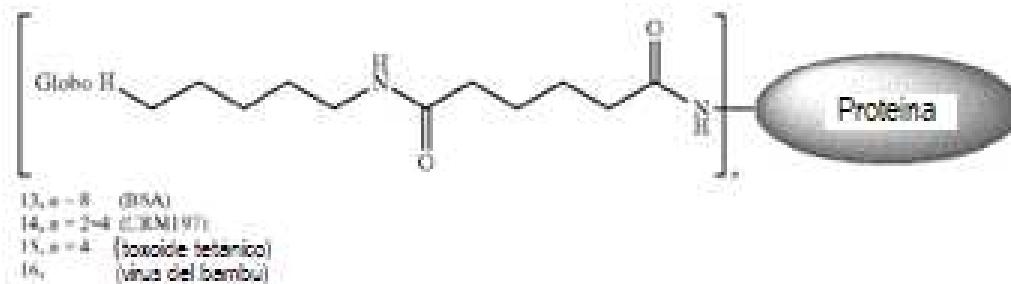
La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan con fines de demostración más que de limitación.

Ejemplo 1: Preparación de una Vacuna con una Mayor Razón de Carbohidrato/Proteína Toxina y Extracción de OBI-821

De acuerdo con métodos conocidos en la técnica, se conjugó Globo H con KLH o DT, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.544.952 o 8.268.969. La vacuna resultante comprendía Globo H:DT (razón de moléculas de Globo H con respecto a DT=2-4:1)

Procedimiento General para Generar Glicoconjugados

Los glicoconjugados se fabricaron de la siguiente manera:



Se disolvieron BSA, DT-CRM197 y toxoide tetánico (Adimmune, Taiwán) en tampón fosfato 100 mM pH 7,2 (~5 mg/ml) y se añadieron a la solución de 30 a 40 equivalentes de semiester 35 de Globo H. La mezcla se agitó suavemente durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se diluyó con agua desionizada y se sometió a diálisis frente a 5 cambios de agua desionizada. A continuación, la solución se liofilizó hasta un polvo de color blanco. Los productos conjugados Globo H-proteína obtenidos se pueden caracterizar mediante análisis MALDI-TOF para determinar la tasa de incorporación de carbohidratos. No se determinaron 41 (GH-BSA), MALDI-TOF encontrado 76029, 42 (GH-DT-CRM197) encontrado 62138, 43 (GH-TT) encontrado 162902, 44 (GH-BaMV). Análisis MS MALDI-TOF para productos glicoconjugados. Los productos glicoconjugados y las proteínas portadoras primarias se pueden reconstituir con ddH₂O (~1 µg/µl). La matriz, ácido sinapínico, se preparó recientemente con acetonitrilo y agua desionizada 1:1, obteniendo una concentración de matriz final de 10 mg/ml que incluye TFA al 0,1%. La solución de matriz y los productos glicoconjugados se cargaron y mezclaron suavemente, a continuación la placa se secó al aire. La calibración era imperativa utilizando albúmina de suero bovino antes de la medición. Cada muestra de producto glicoconjugado y proteína primaria se detectó en modo lineal positivo. El peso molecular promedio permite calcular el número promedio de moléculas de carbohidrato incorporadas en la proteína portadora.

Se elaboró una vacuna con una razón de molécula de antígeno carbohidratado: molécula de proteína toxina superior a 5:1 de acuerdo con las siguientes etapas:

(a) Se disolvieron 10 ml-25 ml de Globo H (disponible en OBI Pharma, Taiwán) y un conector de éster *p*-nitrofenílico (disponible de OBI Pharma, Taiwán) en 25 µl de DMF (disponible comercialmente de Sigma-Aldrich, EE.UU.).

(b) Se disolvieron 25 mg de DT con 2,5 ml de tampón fosfato (es decir, un tampón alcalino con pH> 8).

(c) La mezcla de la etapa (a) se añadió a la mezcla de la etapa (g) a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla resultante tenía un pH entre 8 y 9,2

Resultados: 10 ml de Globo H dieron como resultado vacunas que comprendían Globo H: DT (8:1) y 25 de Globo H dieron como resultado vacunas que comprendían Globo H: DT (24:1), según lo determinado por MS MALDI-TOF.

Preparación de saponina OBI-821

La saponina OBI-821 se extrajo del extracto de *Quillaja saponaria* de acuerdo con las siguientes etapas:

(a) El extracto de *Quillaja saponaria* se prefiltró mediante cromatografía de fase inversa C18 de partículas grandes, a continuación se purificó mediante cromatografía de fase normal preparativa basada en sílice. Esto dio como resultado OBI-821 bruta.

(b) La OBI-821 bruta de la Etapa (a) se prefiltró de nuevo mediante una cromatografía de fase inversa C18 de partículas grandes, seguida de HPLC preparativa de fase inversa. La sustancia OBI-821 se terminó secuencialmente mediante un procedimiento de desalinización y liofilización.

La saponina OBI-821 purificada extraída de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se analizó mediante espectro de masas. El pico de masa en 1989,01 en la Fig. 5A, el pico de masa en 1989,12 en la Fig. 5B y el pico de masa en 1989,13 ilustran la presencia de compuestos con un peso molecular de aproximadamente 1989. La razón molar de compuestos con un peso molecular de aproximadamente 1989 es: 89,8% en la Fig. 5A, 96,8% en la Fig. 5B y 87,0% en la Fig. 5C. De manera similar, el pico de masa en 1856,97 en la Fig. 5A, el pico de masa en el pico en 1856,02 en la Fig. 5B y el pico de masa en 1857,09 ilustran la presencia de compuestos con un peso molecular de aproximadamente 1857. La razón molar de compuestos con un peso molecular de aproximadamente 1857 es: 10,2% en la Fig. 5A, 3,2% en la Fig. 5B y 13% en la Fig. 5C.

La saponina OBI-821 purificada se analizó adicionalmente mediante cromatografía. La Fig. 6 es una imagen del cromatograma LC-UV (columna: PolyLC PolyHYDROXYETHYL A 200*4,6 mm 5µm, 300A). El primer pico ilustra la presencia de compuestos 1989 V1 (A y B) y compuestos 1857 V1 (A y B) (aproximadamente 65,94%), y el segundo pico ilustra la presencia de compuestos 1989 V2 (A y B) y compuestos 1857 V2 (A y B) (aproximadamente 34,06%).

La Fig. 7 es una imagen del cromatograma LC-MS (columna: Waters Symmetry ODS 150*2,1 mm). El Pico 1 en el panel superior ilustra la presencia de los compuestos 1989 V1B y V2B (aproximadamente el 2,2%), mientras que el Pico 4 ilustra la presencia de los compuestos 1989 V1A y V2A (aproximadamente el 97,8%). El Pico 2 en el panel inferior ilustra la presencia del compuesto 1857 V1 B y el compuesto 1857 V2 B (aproximadamente 1,9%) y el Pico 3 ilustra la presencia del compuesto 1857 V1A y el compuesto 1857 V2A.

Ejemplo 2: Inmunogenicidad de Vacunas con Mayor Razón de Carbohidrato/Proteína Toxina y Eficacia del Adyuvante de saponina OBI-281

Se realizó la evaluación de la inmunogenicidad *in vivo* de la vacuna Globo H/DT (8:1) en el Ejemplo 1 y la eficacia del adyuvante de saponina OBI-821 utilizando ratones CL57B/6.

Se asignaron al azar ratones CL57B/6 de aproximadamente ocho semanas de edad en los siguientes 4 grupos de estudio:

Grupo	Tratamiento	N (número de ratones)	Vía de administración	Día de inmunización
Globo H-DT/S	Globo H/KLH/saponina OBI-821	6	subcutáneo	Día 0, 7, 14 y 21
Globo H-KLH/C34	Globo H/KLH/C34	6		
Globo H-DT/S	Globo H/DT (razón de moléculas de Globo H con respecto a DT=8:1)/ saponina OBI-821	6		
Globo H-DT/C34	Globo H/DT (razón de moléculas de Globo H con respecto a DT=8:1)/ C34	6		

Se recogieron muestras de sangre a través de la vena facial o retroorbital sin anticoagulante previo a la primera inyección o el Día 0, y tres días después de cada inyección (es decir, los Días 10, 17 y 24). Las muestras de sangre se centrifugaron para separar el suero y las células sanguíneas. Los sueros se recogieron y almacenaron a -20°C, que más tarde se analizaron mediante ELISA. El suero de cada ratón se diluyó en serie para el análisis de IgG anti-Globo H. Se cubrió la placa de ensayo con globo H-cerámica durante la noche antes de bloquear durante 30 minutos con tampón 1X bloqueo (Sigma) y se lavó con PBST. Las muestras de suero diluido se añadieron a la placa de ensayo, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) y se lavaron. Se añadió a la muestra anticuerpo secundario anti-IgG de ratón-AP de cabra (Southern Biotech) y se incubó durante 45 minutos a RT. La placa se lavó de nuevo, seguido de la adición de sustrato cromógeno e incubación a 37°C durante 20 minutos. La reacción se terminó con la adición de una solución de parada. La densidad óptica se cuantificó mediante un lector de placas (Molecular Device) a una longitud de onda de 405 nm. Se utilizó la prueba t de Mann-Whitney para el análisis estadístico. La Fig. 1A y la Fig. 1B muestran el título cuantitativo de IgG Anti-Globo H de las vacunas sometidas a prueba.

Resultados: El título de IgG de ratones inmunizados con Globo H/DT (razón 8:1) fue significativamente mayor que el de Globo H/KLH con un adyuvante C34 ($P < 0,01$). El título de IgG de ratones inmunizados con Globo H/DT (razón 8:1) fue mayor que el de Globo H/KLH con un adyuvante de saponina OBI-821. (Véase Fig. 1 (A)). Independientemente del tipo de proteína portadora utilizada, la saponina OBI-821 provocó un título de IgG mayor estadísticamente significativo en comparación con el adyuvante C34 ($P < 0,05$, véase Fig. 1A y Fig. 1B).

Ejemplo 3: Evaluación de la Inmunogenicidad de Vacunas con una Razón Mayor de Carbohidrato/Proteína Toxina y Eficacia del Adyuvante de Saponina OBI-281 Utilizando Ensayos de ADCC y CDC

Se inmunizaron cuatro grupos de ratas Lewis con las vacunas de la Tabla 3.

Tabla 3: Composición de la Vacuna

Grupos	Composiciones de vacunas
G1	Solución salina tamponada con fosfato (PBS)
G2	7,5 µg GH-DT (razón 8:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)
G3	7,5 µg de GH-DT (razón 8:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT) + 25 µg de saponina OBI-821
G4	7,5 µg de GH-DT (razón 24:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT) + 25 µg de saponina OBI-821

Las ratas se inmunizaron s.c. con las vacunas enumeradas en la Tabla 3 los días 0, 7, 14 y 21. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y plasma antes de la primera inyección (es decir, el día 0) y el Día 10, Día 17 y Día 24.

Los ensayos de ADCC y CDC se realizaron utilizando un método de liberación de Calceína AM conocido en la técnica. El procedimiento se describe a continuación:

Marcaje de células diana con Calceína AM

Se cultivaron células de cáncer de mama MCF-7 (células diana) en Medio Esencial Mínimo complementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM y 0,01 mg/ml de insulina, suero bovino fetal al 10%. Las células diana se añadieron a las placas de 96 pocillos (5x10³ células por pocillo), y se incubaron a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5% humidificada durante la noche. El medio se descartó y cada pocillo se lavó una vez con PBS. Se añadieron 100 L de solución de Calceína-AM 20 M a cada pocillo (2 nmoles por pocillo) y se incubaron a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5% humidificada durante 2 horas. El sobrenadante se secó y cada pocillo se lavó tres veces con PBS.

Célula diana incubada con plasma de muestra

El plasma de muestra se inactivó por calor y se añadieron 50 L de 1/5X plasma de muestra inactivada por calor a cada pocillo, excepto para el control de "Liberación total" y "Fondo". La multiplicidad de dilución final sería 1/10X después de la adición de 50 L de PBMC o suero. Las placas se incubaron a 37°C (en oscuridad) durante 30 min.

Célula diana incubada con PBMC o complemento

Después de la incubación, se añadieron 50 microlitros de PBMC (2x10⁶ células/ml) (para la razón E:T 20:1) a cada pocillo en el ensayo de ADCC, y se añadieron 50 microlitros de 1/10 X suero diluido a cada pocillo en el ensayo de CDC, excepto para el control de "Liberación total" y "Fondo". Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5% humidificada durante 4 horas. El MEM sin rojo fenol que contenía una solución de Triton al 2% (50 microlitros) se añadió al control de "Liberación total" en los últimos 15 minutos del tiempo de incubación, y el MEM sin rojo fenol (50 microlitros) se añadió al control de "Fondo". Las placas se centrifugaron a 100 g durante 5 min y a continuación el sobrenadante de 80 microlitros se transfirió a placas negras de 96 pocillos. La fluorescencia se midió a longitudes de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm.

Las Fig. 2A a 2D muestran las actividades ADCC y CDC *in vivo* de las vacunas G2, G3 y G4.

Resultados: Como se ilustra en la Fig. 2B y 2D, las actividades ADCC y CDC de la vacuna G3 (con un adyuvante de saponina OBI-821) el Día 24 fueron mayores que las de la vacuna G2 (sin un adyuvante de saponina). Como se ilustra en la Fig. 2B y 2D, las actividades ADCC y CDC de la vacuna G4 (la razón Globo H/DT es 24:1) el Día 24 fueron mayores que las de la vacuna G3 (la razón Globo H/DT es 8:1). Estos resultados muestran que el adyuvante de saponina OBI-821 y una vacuna con una razón de antígeno carbohidratado/proteína toxina superior a 5:1 mejoran e inducen una respuesta de ADCC y CDC de mayor duración.

Ejemplo 4: Respuesta Inmunitaria de vacunas Con una Razón Mayor de Carbohidrato/Proteína Toxina y Eficacia del Adyuvante de Saponina OBI-821

Se realizó la evaluación *in vivo* de las vacunas Globo H/DT (8:1) y Globo H/DT (16:1) en el Ejemplo 1 y el adyuvante de saponina OBI-821 utilizando ratones CL57B/6 o ratones Balb/c.

Se asignaron al azar ratones CL57B/6 de aproximadamente ocho semanas de edad en los siguientes 8 grupos de estudio:

Grupo	Tratamiento	N (número de ratones)	Dosis de inmunización y programa
G1	Globo H/KLH/saponina OBI-821	6	2 x s.c.
G2	Globo H/DT (razón 3:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)/ saponina OBI-821	6	Inyecciones los Días 0, 7, 14 y 21.
G3	H/DT(8:1)/saponina OBI-821	6	Cada inyección es de 100 uL
G4	Globo H/DT (razón 8:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)/ saponina OBI-821	6	
G5	Globo H/DT (razón 8:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)/ C34	6	
G6	Globo H/KLH/C34	6	
G7	Globo H/DT (razón 16:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)/ saponina OBI-821	6	
G8	PBS (Solución salina tamponada con fosfato)	3	

Se recogieron muestras de sangre a través de la vena facial o retroorbital sin anticoagulante antes de la primera inyección o el Día 0, el Día 10, 17 y 24. Las muestras de sangre se centrifugaron para separar el suero y las células sanguíneas. Los sueros se recogieron y almacenaron a -20°C, que más tarde se analizaron mediante ELISA. El suero de cada ratón se diluyó en serie para el análisis de IgG e IgM anti-Globo H. La Fig. 3A, la Fig. 3B y la Fig. 4 muestran el título cuantitativo de IgM anti-Globo H e IgG anti-Globo H de las vacunas sometidas a prueba.

Resultados: Las vacunas con un adyuvante de saponina OBI-821 inducen una mayor cantidad de IgM Anti-Globo H e IgG Anti-Globo H estadísticamente significativa en comparación con las vacunas con un adyuvante C34 (Véase la Fig. 3A, Fig. 3B y Fig. 4). Se observaron las siguientes diferencias estadísticamente significativas:

- El título de IgM de la vacuna G3 (saponina OBI-821) fue significativamente mayor que el de la vacuna G5 (C34) el Día 17 ($p=0,02$);
- El título de IgM de la vacuna G1 (saponina OBI-821) fue significativamente mayor que el de la vacuna G6 (C34) el Día 17 ($p=0,03$),
- El título de IgM de la vacuna G3 (saponina OBI-821) fue significativamente mayor que el de la vacuna G5 (C34) el Día 24 ($p=0,03$),
- El título de IgG de la vacuna G3 (saponina OBI-821) fue significativamente mayor que el de la vacuna G5 (C34) el Día 17 ($p=0,001$),
- El título de IgG de la vacuna G1 (saponina OBI-821) fue significativamente mayor que el de la vacuna G6 (C34) el Día 17 ($p=0,003$),
- El título de IgG de la vacuna G3 (saponina OBI-821) fue significativamente mayor que el de la vacuna G5 (C34) el Día 24 ($p=0,03$), y
- El título de IgG de la vacuna G1 (saponina OBI-821) fue significativamente mayor que el de la vacuna G6 (C34) el Día 24 ($p=0,004$).

Estos resultados ilustran que el adyuvante de saponina OBI-821 mejora significativamente la respuesta de IgM e IgG en comparación con el adyuvante C34.

Globo H/KLH/saponina OBI-821 (G1) induce títulos de IgM e IgG significativamente mayores en comparación con Globo H/DT (3:1)/saponina OBI-821 (G2) el Día 17 y el Día 24. Sin estar ligado por una teoría particular, se cree que G1 tiene una densidad de carbohidratos más alta (aproximadamente 700 unidades de Globo H por proteína portadora KLH) y provoca una respuesta inmunitaria más fuerte, mientras que G2 tiene una densidad de carbohidratos más baja (3 unidades de Globo H por proteína portadora DT) y provoca una respuesta inmunitaria más débil. Se observaron las siguientes diferencias estadísticamente significativas:

- El título de IgM de la vacuna G1 (KLH) fue significativamente mayor que el de la vacuna G2 (DT) el Día 17 ($p=0,003$),
- El título de IgM de la vacuna G1 (KLH) fue significativamente más mayor que el de la vacuna G2 (DT) el Día 24

- ($p=0,03$),
- El título de IgG de la vacuna G1 (KLH) fue significativamente mayor que el de la vacuna G2 (DT) el Día 24 ($p=0,004$).

5 Los títulos de IgM e IgG de Globo H/DT (razón 8:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)/saponina OBI-821 (G3 y G4) y Globo H/DT (razón 16:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)/saponina OBI-821 (G7) son comparables a los de Globo H/KLH/saponina OBI-821 (G1) el Día 17 y el Día 24 (véase la Fig. 4). A pesar de una menor densidad de carbohidratos que GH-KLH (razón 700:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT), GH-DT (razón 8:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT) mostró una inmunogenicidad comparable con GH-KLH.

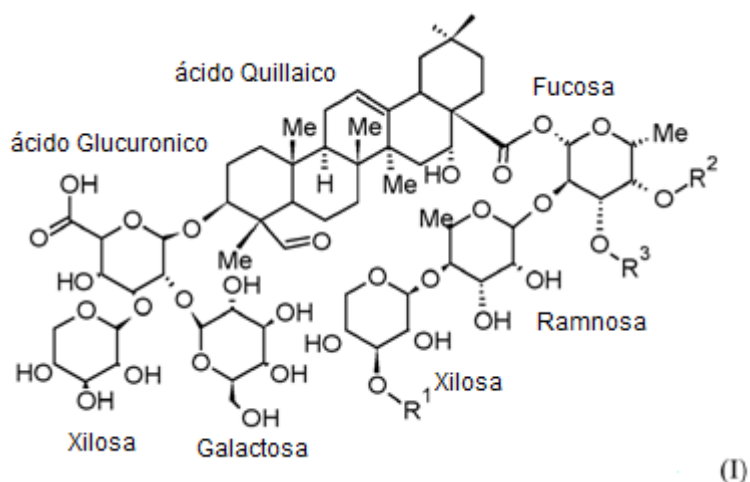
10 Las vacunas con una razón Globo H/DT más alta (razón 8:1 o 16:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT) inducen títulos de IgM e IgG más altos y de mayor duración en comparación con las vacunas con una razón Globo H/DT más baja (3:1). Se observaron las siguientes diferencias estadísticamente significativas:

- El título de IgM de la vacuna G3 (razón 8:1 - razón de moléculas de Globo H con respecto a DT) fue significativamente mayor que el de la vacuna G2 (razón 3:1) el Día 17 ($p=0,02$),
- El título de IgM de la vacuna G7 (razón 16:1 - razón de moléculas de Globo H con respecto a DT) fue significativamente mayor que el de la vacuna G2 (razón 3:1) el Día 17 ($p=0,006$),
- El título de IgG de la vacuna G3 (razón 8:1 - razón de moléculas de Globo H con respecto a DT) fue significativamente mayor que el de la vacuna G2 (razón 3:1) el Día 17 ($p=0,01$),
- El título de IgG de la vacuna G7 (razón 16:1 - razón de moléculas de Globo H con respecto a DT) fue significativamente mayor que el de la vacuna G2 (razón 3:1 - razón de moléculas de Globo H con respecto a DT) el Día 17 ($p=0,03$),
- El título de IgG de la vacuna G3 (razón 8:1 - razón de moléculas de Globo H con respecto a DT) fue significativamente mayor que el de la vacuna G2 (razón 3:1) el Día 24 ($p=0,01$),
- El título de IgG de la vacuna G7 (razón 16:1 - razón de moléculas de Globo H con respecto a DT) fue significativamente mayor que el de la vacuna G2 (razón 3:1 - razón de moléculas de Globo H con respecto a DT) el Día 24 ($p=0,01$),

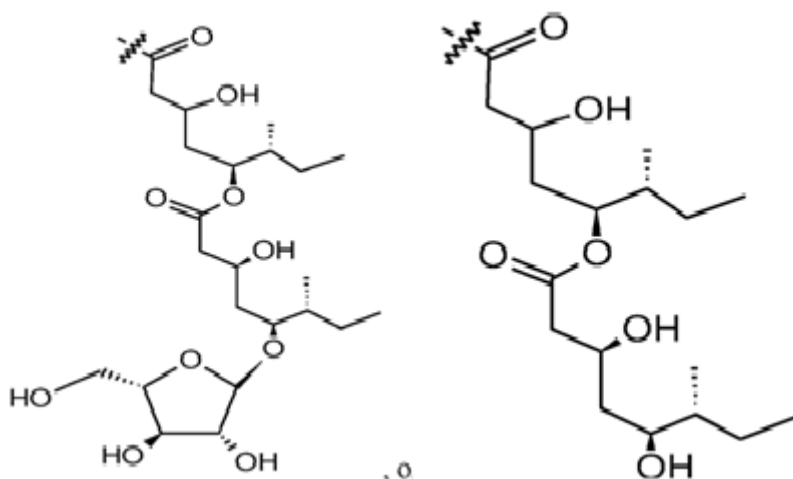
El título de IgG de Globo H/DT (razón 8:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)/saponina OBI-821 (G3) y Globo H/DT (16:1)/saponina OBI-821 (G7) es significativamente mayor que el de Globo H/DT (razón 3:1 de moléculas de Globo H con respecto a DT)/saponina OBI-821 (G2) los Días 17 y 25 ($P < 0,05$).

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna contra el cáncer, que comprende:
(a) un antígeno carbohidratado asociado al tumor; y
(b) una toxina diftérica (DT),
- 5 en donde la razón del antígeno carbohidratado asociado al tumor con respecto a DT varía de 5:1 a 24:1,
y el antígeno carbohidratado asociado al tumor se selecciona entre Globo H, antígeno embrionario específico de etapa 3 (SSEA-3) o antígeno embrionario específico de etapa 4 (SSEA-4).
2. La vacuna contra el cáncer de la reivindicación 1, en donde DT es material de reacción cruzada de toxina diftérica o toxoide diftérico.
- 10 3. La vacuna contra el cáncer de la reivindicación 2, en donde el material de reacción cruzada de toxina diftérica se selecciona entre material de reacción cruzada de toxina diftérica 30 (DT-CRM 30), material de reacción cruzada de toxina diftérica 45 (DT-CRM45), reacción cruzada de toxina diftérica material 176 (DT-CRM 176), material de reacción cruzada de toxina diftérica 197 (DT-CRM 197) o material de reacción cruzada de toxina diftérica (DT-CRM 228).
4. La vacuna contra el cáncer de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un adyuvante de saponina.
- 15 5. La vacuna contra el cáncer de la reivindicación 4, en donde el adyuvante de saponina es un compuesto de fórmula (I)

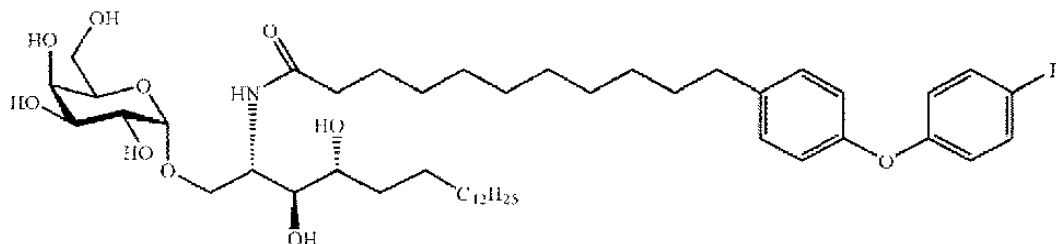


- 20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde,
R¹ se selecciona entre β-D-Apiosa o β-D-Xilosa; y,
R² y R³ se seleccionan entre H, alquilo,



6. La vacuna contra el cáncer de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un adyuvante de α -galactosilceramida (α -GalCer).

7. La vacuna contra el cáncer de la reivindicación 6, en donde el adyuvante de α -GalCer tiene la siguiente estructura:



8. La vacuna contra el cáncer como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en la inhibición de células cancerosas en un sujeto.

9. La vacuna contra el cáncer para su uso según la reivindicación 8, en donde el cáncer es cáncer que expresa Globo H.

10. La vacuna contra el cáncer para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer que expresa Globo H es cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer de recto, cáncer de vías biliares, cáncer de hígado, cáncer bucal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer nasofaríngeo, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer de testículo, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer oral, cáncer neuroendocrino, cáncer suprarrenal, cáncer de tiroides, cáncer de huesos, cáncer de piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, melanoma o tumor cerebral.

11. La vacuna contra el cáncer para su uso según la reivindicación 8, en donde el sujeto es un ser humano.

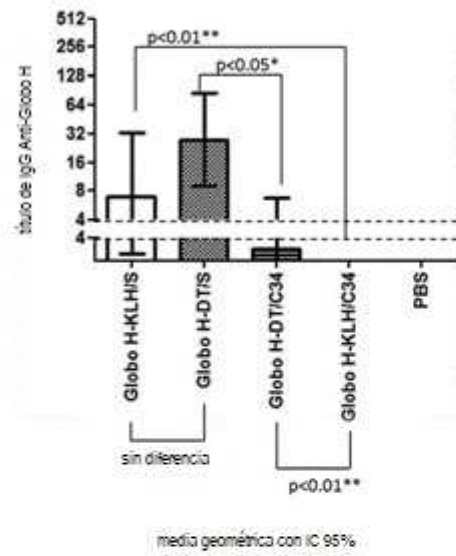
12. Una composición farmacéutica, que comprende

(a) la vacuna contra el cáncer de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y

(b) un portador farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

A



B

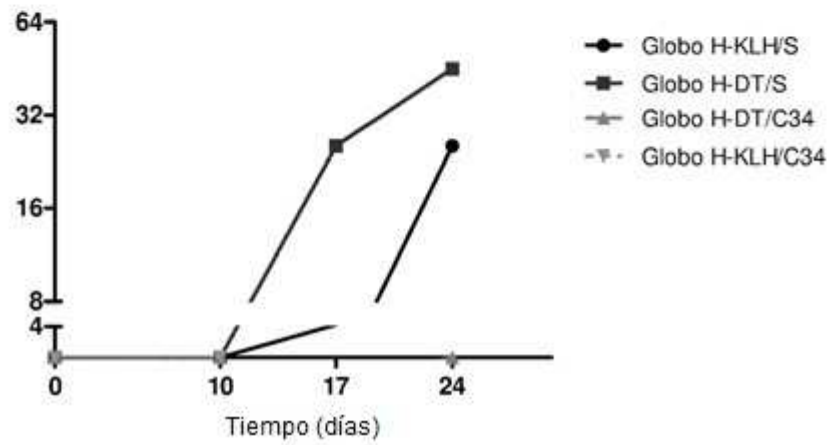


Fig. 2

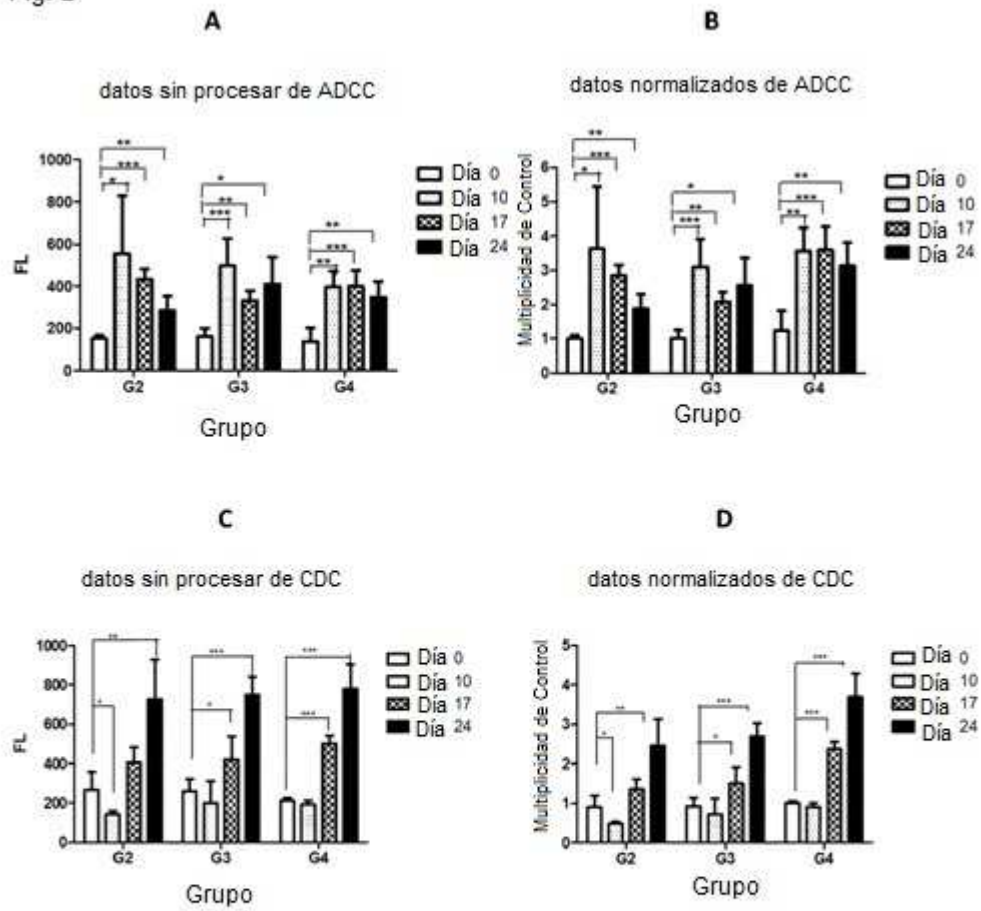
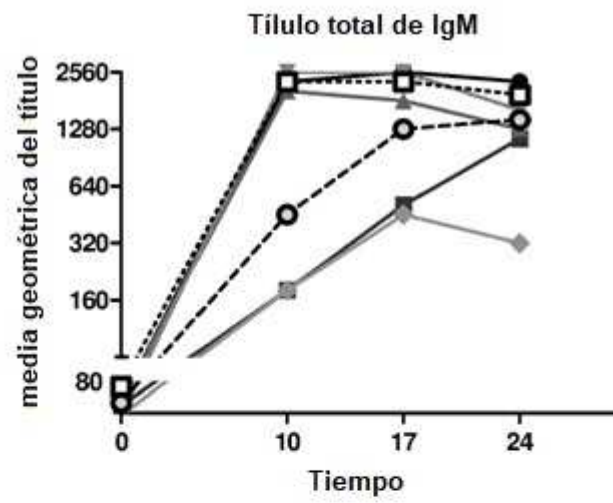


Fig. 3

A



B

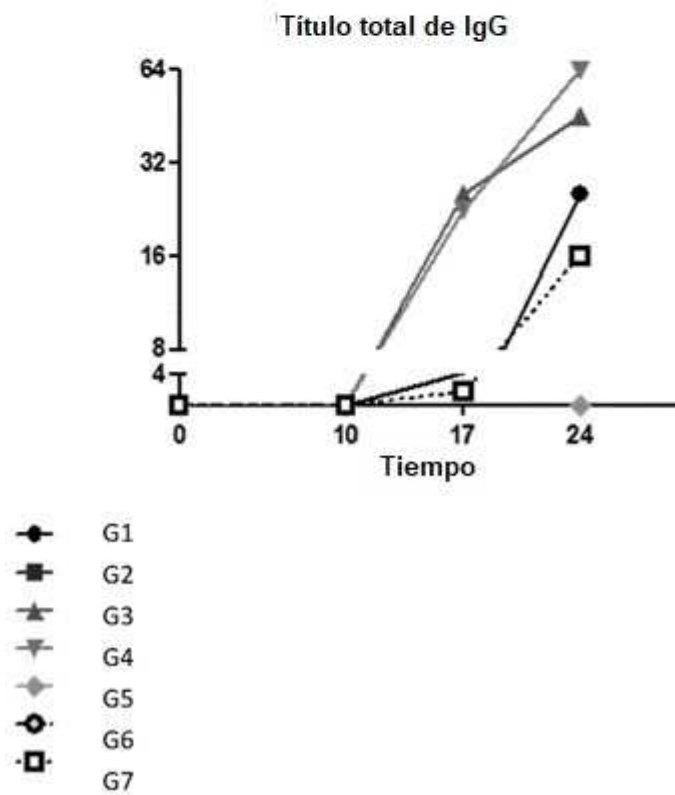


Fig. 4

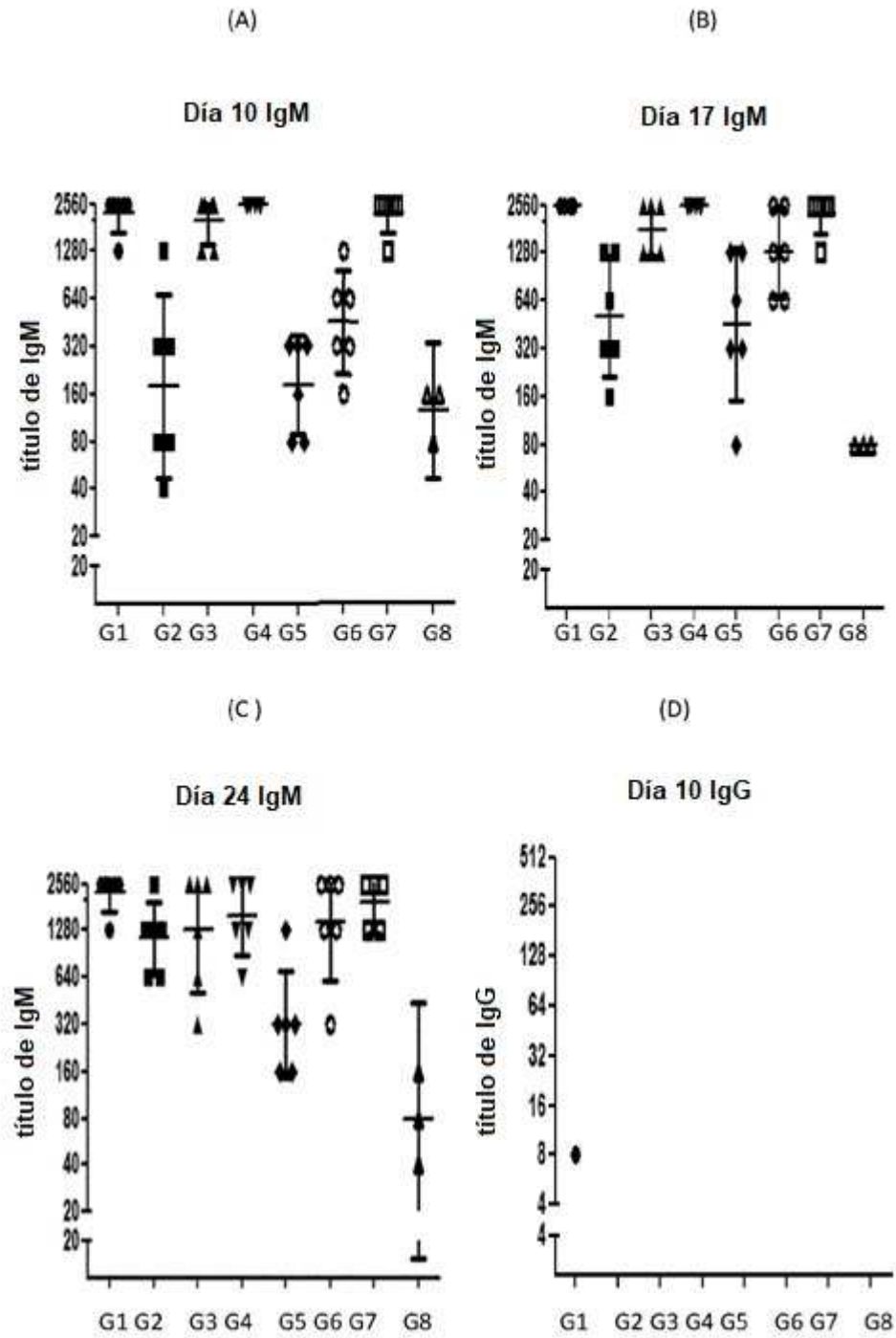


Fig. 4

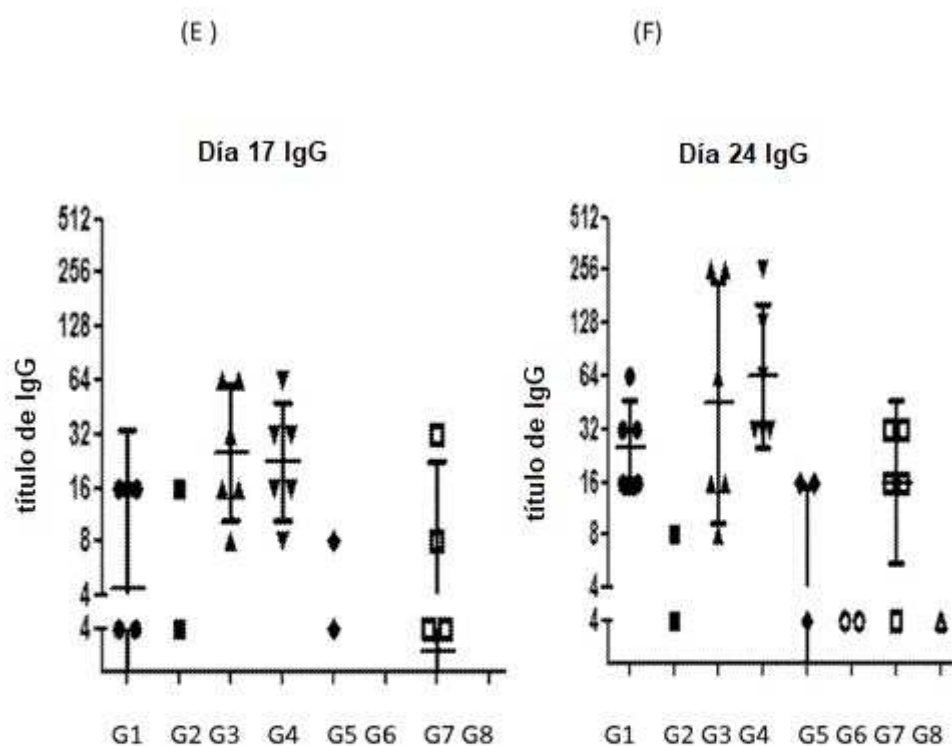


Fig. 5A

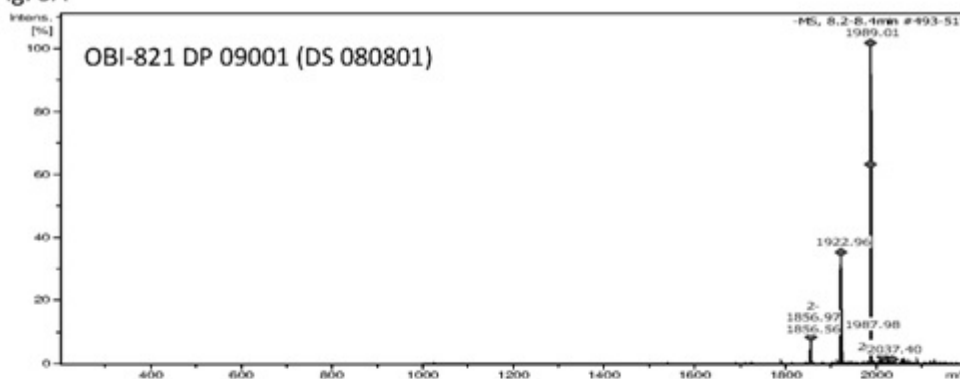


Fig. 5B

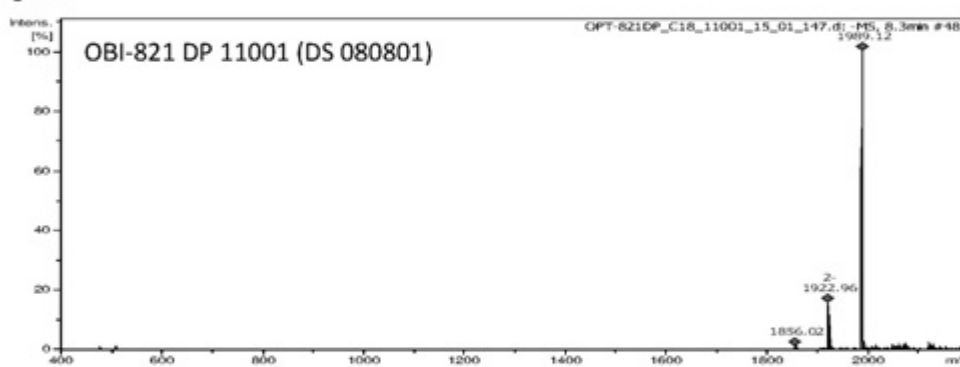


Fig. 5C

OBI-821 DP 13001 (DS 120531)

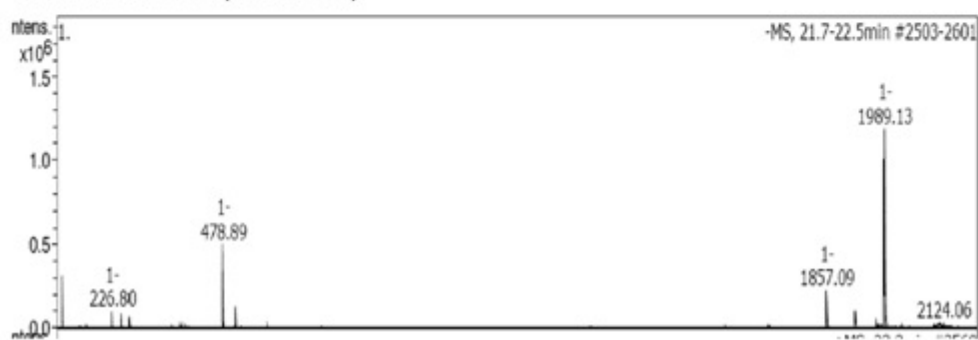


Fig. 6

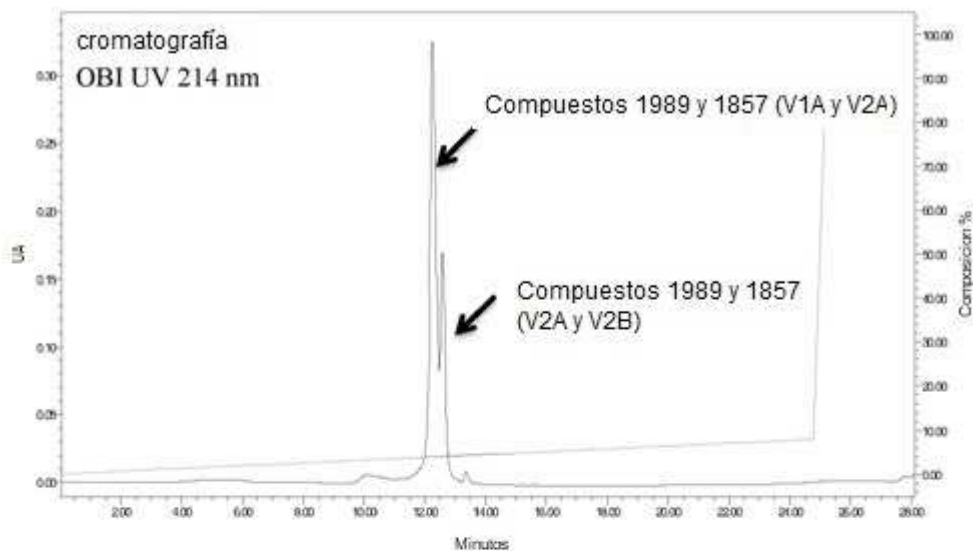


Fig. 7

