NANO-PARTÍCULAS QUE CONTIENEN EL GANGLIÓSIDO GM3 COMO INMUNOMODULADORAS

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con los campos de la inmuno-nanotecnología y de la inmuno-oncología, especialmente con immuno-moduladores para tratamiento de individuos con cáncer y/o infecciones crónicas. Particularmente describe un inmunomodulador nano-particulado especializado en interferir específicamente con las Células Supresoras de Origen Mieloide (MDSC) en estos pacientes y además restaurar la respuesta de células T.

ANTECEDENTES

Recientemente, se han obtenido resultados clínicos importantes con el uso de los anticuerpos (Acs) *immune checkpoint inhibitors,* con la capacidad de inducir respuestas objetivas de larga duración con un impacto significativo en la supervivencia de los pacientes. Estos tratamientos, que modulan al sistema inmune y restituyen la capacidad del paciente para destruir las células tumorales, han provocado el renacer de la inmunoterapia del cáncer con especial atención en el diseño de nuevos inmunomoduladores.

No obstante, existen otros circuitos supresores de la respuesta inmune antitumoral, que constituyen blancos importantes para el desarrollo de nuevos inmunomoduladores (Malmberg K.J.y cols. (2004) Cancer Immunol Immunother 53(10): 879-92). Las células supresoras de origen mieloide (MDSC-del inglés “myeloid-derived suppressor cells”) constituyen una de las principales poblaciones celulares, movilizadas por los tumores, con capacidad de suprimir la respuesta inmune (Mantovani A. y cols. (2010) Curr Opin Immunol 22(2): 231-7; Condamine T. y cols. (2011) Trends Immunol 32(1): 19-25). De manera particular, tal y como plantea Shipp y cols. en un artículo de revisión, la frecuencia de MDSC circulantes constituye un factor de mal pronóstico en pacientes con tumores de una gran variedad de localizaciones. Además, niveles circulantes elevados de estas poblaciones se asocian con un menor beneficio de las terapias convencionales como quimioterapia, radioterapia e incluso Acs anti-*checkpoints* (Shipp C. y cols. (2016) Cell Mol Life Sci 73(21): 4043-61). En humanos, como consenso general, se describen tres poblaciones de MDSC: las MDSC inmaduras o de estadio intermedio (I-MDSC), definidas como $LIN^{-}CD11b^{+}CD33^{+}HLA\text{-}DR^{-}$; las MDSC monocíticas (mMDSC), definidas como $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{bajo/-}$ y las MDSC granulocíticas (gMDSC), con fenotipo $CD11b^{+}CD33^{+}CD14^{-}CD15^{+}$ ($CD66b^{+}$) (Bronte V.

y cols. (2016) Nat Commun 7: 12150). Las tres poblaciones se consideran supresoras de la respuesta inmune específica a los tumores (Shipp C. y cols. (2016) Cell Mol Life. Sci 73(21): 4043-61).

Las estrategias en investigación para contrarrestar la inmunosupresión inducida por las MDSC se focalizan en tres aproximaciones: (1) reducir el número, (2) afectar su función e (3) influir en su diferenciación. En estas direcciones, ya se han reportado resultados alentadores con varias de las drogas evaluadas (Najjar Y. G. y cols. (2013) Frontiers in Oncology 3(49): 1–9).

De particular relevancia para la presente invención, dentro de las soluciones terapéuticas que tienen como blanco las MDSC se encuentran las basadas en sistemas nano-particulados. Es conocido que las nano-partículas ofrecen un rango amplísimo de aplicaciones y que en dependencia del tamaño y las características superficiales, se comportan *in vivo* de manera diferente. El tamaño, por ejemplo, condiciona el sitio de drenaje y las características superficiales influyen en los mecanismos de adhesión y captura (Wilkerson A. y cols (2017) Current Topics in Medicinal Chemistry 17: 1843-57). En este sentido, como informan Serda R. E. los sistemas particulados con diámetros en el rango de 500-2000 nm preferencialmente son capturados en el sitio de inyección y movidas a los linfonodos (LN), mientras que las partículas de entre 20 y 200 nm drenan pasivamente a los LN donde interactúan con las células residentes (Serda R. E. (2013) Int J of Nanomed 8: 1683–1696).

Hasta la fecha se han descrito solamente seis estrategias con efecto sobre las MDSC basadas en nano-partículas, entre ellas se encuentran: nano-partículas cargadas con gemcitabina, nano-partículas cargadas con la quimiocina CCL21, nano-partículas cargadas con CpG, liposomas cargados con ácido retinoico todo-trans y nano-partículas ingenierizadas con glucanos (Wilkerson A. y cols. (2017) Current Topics in Medicinal Chemistry 17:1843-57). Estas cinco estrategias anteriores comparten tres características fundamentales: la talla de las nano-partículas está comprendida en un intervalo de 30 a 250 nm, su uso está restringido a modelos murinos y constituyen partículas sin efecto *per se* sobre las MDSC sino que son sistemas portadores del agente biológico.

La sexta estrategia basada en sistemas nano-particulados con efecto sobre las MDSC es el uso de proteoliposomas de muy pequeña talla que contienen al ganglióside GM3 (VSSP-del inglés *Very small size proteoliposomes*). Estas preparaciones pueden ser consideradas como la solución técnica más cercana a la presente invención. Inicialmente, Molina y cols, en la patente US 8,591,917 B2, describen un método para estimular la respuesta inmune en sujetos, mediante el uso del VSSP administrado por vía subcutánea (SC). Adicionalmente, los estudios de Fernández y cols. y Oliver y

cols. enseñan que tanto en ratones sanos, con tumor y leucopénicos por el uso de la quimioterapia, la administración de VSSP induce en el bazo, un aumento significativo de células con fenotipo similar a las MDSC pero con capacidad supresora marcadamente disminuidas (Fernández A. y cols. (2011) J Immunol 186: 264-74; Oliver L. y cols. (2012) Vaccine 30: 2963–72). Otros estudios también describen que el empleo de VSSP en ratones portadores de tumor impide la presentación cruzada de antígenos por las MDSC inducidas por el tumor e induce su diferenciación a células presentadoras de antígeno (Fernández A. y cols. (2014) J ImmunoTherapy of Cancer 2: 5). La forma de obtener estas VSSP, se describe por Rodríguez y cols. en la patente US 6,149,921, enfatizando que la conjugación de las proteínas de *Neisseria meningitidis* se mezclan con un exceso de gangliósido GM3 en presencia de un detergente, que luego se elimina por un método de diálisis. Adicionalmente, Estevez y cols. describen que posterior a la diálisis, ocurre un proceso de ultra-centrifugación que descarta los conjugados con mayor masa y tamaño (Estevez F. y cols. (2000) Vaccine 18: 190-7).

El novedoso preparado inmunomodulador que se describe en la presente invención, cuyo principio activo también incluye conjugados de vesículas de membrana de *N. meningitidis* y el gangliósido GM3, presenta características particulares de talla, carga superficial y una morfología asociada a sistemas nano-particulados nunca antes descritas en ninguna solución técnica o publicación científica anterior. Estas características le aportan a esta nueva invención, propiedades ventajosas y sorprendentes en cuanto a su efecto sobre las MDSC, respecto a las descritas anteriormente por Fernández A. y cols y Oliver L. y cols. La presente invención, al ser utilizada preferentemente por vía SC para el tratamiento de pacientes con tumores, y opuesto a lo que enseña el estado del arte precedente, induce una disminución conveniente y significativa de las gMDSC y las mMDSC, con impacto en la respuesta de linfocitos T y en la supervivencia de los pacientes tratados. Por tanto, la novedad de la presente invención consiste en proporcionar un nuevo inmunomodulador con efecto en la disminución de las MDSC en pacientes con tumores.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

En una realización es objeto de la presente invención una composición farmacéutica para inmunomodular la respuesta inmune en pacientes con cáncer que comprende nano-partículas formadas mediante la conjugación hidrofóbica del complejo de proteínas de membrana externa (CPME) de la bacteria *N. meningitidis* al gangliósido GM3, donde la razón de conjugación proteína-gangliósido va desde 1,5:1 hasta 10:1.

Particularmente, dicha composición se caracteriza por una distribución monomodal de volumen en un rango de 15-25 nm de tamaño de partícula, índice de polidispersión de 0.230, potencial Z negativo con valor nominal en el rango entre 25-45 mV.

En una realización particular, la presente invención se relaciona con el uso de la composición farmacéutica objeto de la presente invención en el tratamiento del cáncer y particularmente como inmunomodulador de las MDSC en pacientes con tipos de cáncer que elevan la presencia de estas células.

En otra realización la presente invención se relaciona con un método de tratamiento a un sujeto que lo necesite que comprende administrar la composición farmacéutica descrita en la presente invención por vía SC, intradérmica, intramuscular, intratumoral o por aplicación directa sobre mucosas con una frecuencia semanal durante al menos un total de cuatro dosis y posteriormente dosis quincenales o mensuales de mantenimiento por al menos seis meses.

En una realización particular, es objeto de la presente invención un método de selección de pacientes con cáncer como candidatos a recibir el tratamiento con la composición farmacéutica descrita, que implica:

- extraer una muestra de sangre y/o tejido tumoral del paciente y
- determinar los niveles de MDSC en dicha muestra de sangre y/o tejido tumoral.

Se considerarán candidatos a recibir dicho tratamiento aquellos pacientes que tienen una frecuencia o número absoluto de MDSC alto en sangre o los que sean positivos en cuanto a su grado de infiltración de MDSC en el tejido tumoral.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Composición inmunomoduladora

La presente invención aporta un sistema inmunomodulador que disminuye significativamente las MDSC circulantes en aquellos pacientes con cáncer que las presenten elevadas en circulación o en el tumor. Un sistema inmunomodulador puede ser definido como aquel capaz de eliminar o modular alguno de los mediadores supresores de la respuesta inmune, como es el caso de las MDSC.

El objeto inmunomodulador que se reclama en la presente invención, consiste en nano-partículas obtenidas a partir de la membrana externa de la bacteria Gram-negativa, *N. meningitidis* asociadas al gangliosido GM3. Esta invención establece que primeramente se dispersa el CPME de *N. meningitidis* en una solución buffer Tris-HCL que contiene una mezcla de desoxicolato de sodio (10-40 mM) y dodecil sulfato de sodio (1-10 mM) en un reactor con agitación por un plazo de entre 1 y 36 horas. A

continuación se añade una masa del ganglιósido GM3 entre 0,6 y 10 veces menor a la masa añadida de CPME, de manera que la relación proteína:ganglιósido está entre 1,5:1 a 10:1 y se prolonga la agitación. La formación de las nano-partículas se logra mediante el empleo de un sistema de filtración tangencial con membranas de entre 10kDa y 100kDa y a una presión transmembránica de entre 1,15 y 1,75 bar, de manera que los detergentes son totalmente eliminados. La solución remanente ultrafiltrada se ultracentrifuga a 100000 *g* y se concentra para ajustar su concentración a la dosificación deseada entre 0,1 y 2 mg/ml de CPME y se esteriliza por filtración en cápsula estéril de 0,2 µm de tamaño de poro.

Con la conjugación de una relación de masa de proteína y ganglιósido favorable a la cantidad de proteína y el proceso de ultrafiltración tangencial en condiciones controladas, se obtiene una preparación con características definidas que nosotros nombramos VSSP-iMod. El análisis de morfología, talla y densidad superficial de carga de las partículas demuestran la presencia de una formulación heterogénea, nano-particulada, de entre 15-25 nm de talla y con un potencial Z negativo de valor nominal entre 25-45 mV.

Métodos de identificación y/o selección de los pacientes para el tratamiento con VSSP-iMod

Para la selección de los pacientes a los cuales se les aplicará el VSSP-iMod se determina el nivel de gMDSC y mMDSC que pudieran suprimir la respuesta T específica a los tumores. Un aumento de MDSC debido a la presencia de un tumor, se puede determinar por la evaluación de las distintas subpoblaciones de estas células en circulación o en el microambiente tumoral. Además, su presencia implica el incremento de determinadas proteínas plasmáticas y DNA circulantes. Las fuentes de muestras para la evaluación incluyen tanto sangre periférica como muestras de tumor que incluyen pero no se limitan a biopsias de tumores, proteínas plasmáticas circulantes, líquido ascítico y DNA circulante.

El incremento de estas células se puede determinar mediante un ensayo diagnóstico o pronóstico utilizando citometría de flujo, inmunohistoquímica (IHC), ELISA, inmunofluorescencia o reacción en cadena de la polimerasa. Por el contrario, un paciente, que por su estadio o localización tumoral, no tiene incrementados los niveles de MDSC, es aquel con niveles más altos respecto a donantes sanos normales, pero que no alcanza los niveles considerables observados en pacientes de la misma patología.

La determinación de los niveles de MDSC en las muestras de sangre de los pacientes se realiza por citometría de flujo, donde se analizan ambas poblaciones dentro de la

región $FSC^{intermedio/alto}/SSC^{bajo/alto}$. En particular, para la población gMDSC, se selecciona la población doble positiva para CD11b y CD33 y dentro de esta, la subpoblación positiva para CD66b y negativa para CD14. Para las mMDSC se selecciona la población negativa o de baja expresión de HLA-DR y positiva para CD14.

En función de estos resultados, y relativo a la misma determinación para donantes sanos pareados por edad y sexo, los niveles de MDSC pueden ser clasificados como sigue, según su frecuencia o número absoluto:

- Negativo: Valores de porciento y/o número en el rango determinado por la media de los valores normales (M) +/- la desviación estándar con un 95% de confianza.
- Débil: Valores de porciento y/o número 2M ≤ MDSC< 3M respecto a M.
- Alta: Valores de porciento y/o número con valores 3M ≤ MDSC.

Los pacientes con frecuencia o número absoluto de MDSC en sangre alto serán sometidos a tratamiento con VSSP-iMod.

Para determinar los niveles de MDSC en las muestras de tejidos tumorales, puede utilizarse la medición por técnicas de IHC de las células CD33+. Para ello se debe determinar el porcentaje de células CD33+ en el tejido y se expresa como sigue:

- Negativo: Menos del 10% de células positivas
- Positivo/Bajo infiltrado MDSC: Entre el 10-19% de células positivas
- Positivo/Alto infiltrado MDSC: Más del 20% de células positivas

En dependencia del tipo histológico y su estadio se puede considerar que un tumor recluta MDSC siempre que sea positivo en cuanto a su grado de infiltración de células CD33+.

Aplicación terapéutica y métodos de tratamiento

La presente invención proporciona una composición inmunomoduladora especializada en disminuir las MDSC de fenotipo tanto gMDSC como mMDSC, lo cual establece una solución de peculiar interés para la inmuno-oncología, donde se conoce que las MDSC constituyen una nodo supresor esencial de la respuesta inmune antitumoral.

La progresión de determinados tumores se acompaña del reclutamiento al sitio tumoral de las MDSC, para las que se han descrito mecanismos especializados en suprimir la respuesta inmune antitumoral de linfocitos T y NK. Esta invención propone que a aquellos pacientes, que presenten elevadas las gMDSC y/o las mMDSC, en circulación y/o en el tumor, se les pueden disminuir significativamente mediante el tratamiento con VSSP-iMod. Esta disminución permitirá, en estos pacientes, que la

respuesta inmune antitumoral natural o inducida por alguna terapia, no sea suprimida por las MDSC y que se traduzca en la supervivencia de los pacientes tratados.

El inmunomodulador VSSP-iMod de la presente invención se puede introducir en el paciente por vía: SC, intradérmica, intramuscular, intratumoral o por aplicación directa sobre mucosas.

Entre los tipos de cáncer que se pueden tratar con el inmunomodulador VSSP-iMod objeto de la presente invención se incluyen aquellos para los que se ha reportado que reclutan MDSC como mecanismo inmunosupresor de la respuesta inmune antitumoral. Más particularmente, entre los ejemplos de estos cánceres se incluyen melanoma, cáncer de próstata, cabeza y cuello, ovario, vejiga, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón de células no pequeñas, leucemia linfocítica crónica, carcinoma de esófago de células escamosas, linfoma de Hodgkin, carcinoma renal y carcinoma mamario.

El rango de dosis a emplear en humanos del inmunomodulador VSSP-iMod se encuentra entre 100 µg y 2 mg, preferiblemente 200 µg a 1200µg (según contenido del CPME).

Dicho inmunomodulador se administra en los sujetos con una frecuencia semanal durante al menos un total de cuatro dosis para disminución rápida de MDSC y posteriormente dosis quincenales o mensuales de mantenimiento por al menos seis meses. Este tratamiento puede administrarse de forma crónica durante todo el tiempo que lo requiera el paciente.

La presente invención queda aún más elaborada con los siguientes ejemplos y dibujos. Sin embargo, estos ejemplos no deberían ser interpretados como una limitación del ámbito de la invención. En dichos ejemplos se incluyen detalles experimentales que permiten constatar las características particulares físico-químicas del VSSP-iMod y su eficacia sobre la disminución, en pacientes tratados, de las MDSC. Además, los ejemplos muestran el impacto de esta disminución sobre la respuesta de linfocitos T y datos de impacto en la supervivencia de los pacientes tratados.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Evaluación por Espectroscopía de Correlación Fotónica del diámetro de las partículas de VSSP-iMod.

Figura 2. Evaluación por Espectroscopía de Correlación Fotónica del Potencial Z de las partículas de VSSP-iMod.

Figura 3. Imagen de la Morfología de las partículas de VSSP-iMod por Microscopía de Fuerza Atómica.

Figura 4. Evaluación por citometría de flujo del efecto del tratamiento con VSSP-iMod en pacientes de carcinoma renal metastásico (mRCC) de **a)** la frecuencia de gMDSC y **b)** % de pacientes con frecuencia de gMDSC por encima y debajo de la mediana.

Figura 5. Evaluación por citometría de flujo del efecto del tratamiento con VSSP-iMod sobre la capacidad de las MDSC de suprimir la proliferación de: **a)** linfocitos TCD4+ y **b)** linfocitos TCD8+.

Figura 6. Evaluación por citometría de flujo del efecto del tratamiento con VSSP-iMod en pacientes con carcinoma mamario sobre la frecuencia de: **a)** la frecuencia y % de pacientes con frecuencia de gMDSC por encima y debajo de la mediana, **b)** la frecuencia y % de pacientes con frecuencia de mMDSC por encima y debajo de la mediana.

Figura 7. Determinación por citometría de flujo del efecto del tratamiento con VSSP-iMod sobre el número absoluto de linfocitos TCD8+ en pacientes con carcinoma mamario.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. El VSSP-iMod presenta un tamaño y carga superficial definidos.

La talla en nanómetros y potencial Z de las partículas que conforman el VSSP-iMod se midieron por Espectroscopía de Correlación Fotónica. Las muestras se evaluaron por triplicado, los valores de talla y potencial Z se obtuvieron mediante los algoritmos CONTIN y Smoluchowski respectivamente. Como se muestra en la Figura 1, el VSSP-iMod mostró una distribución monomodal en un rango de 15-25 nm en distribución de volumen, con un índice de polidispersión (PDI) de 0.230, lo que significa que estamos en presencia de una formulación heterogénea de partículas. Adicionalmente, el VSSP-iMod presentó un potencial Z negativo y su valor nominal está en el rango entre 25-45 mV como se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 2. Morfología nano-particulada de VSSP-iMod.

Las imágenes de las VSSP-iMod se obtuvieron en un Microscopio Multimodo de Fuerza Atómica y se utilizó un cantilever de silicio. Se aplicó 50µL de muestra a una mica previamente funcionalizada con una solución de cloruro de níquel 50 mol/L. Al VSSP-iMod, previo a la aplicación a la mica, se le realizó una dilución 1/10 con solución tampón Tris 10 mmol/L pH 8.5. En la imagen de la Figura 3 se muestra una formulación heterogénea compuesta de estructuras nano-particuladas de naturaleza

esférica en el orden de las decenas de nanómetros, lo que está en total correspondencia con lo obtenido por Espectroscopia de Correlación de Fotones.

Ejemplo 3. El VSSP disminuye la frecuencia y la actividad supresora de MDSC en pacientes con mRCC.

Se evaluó el efecto del VSSP-iMod sobre las MDSC en pacientes con mRCC. Para ello quince pacientes con este diagnóstico, se trataron con 400µg de VSSP-iMod por vía SC en la región deltoidea. Se administraron un total de cuatro dosis de VSSP-iMod con una frecuencia semanal seguidas de una dosis mensual hasta completar 6 meses de tratamiento. En este ensayo se evaluó por citometría de flujo la frecuencia de G-MDSC. Para ello se analizaron un total de 200 000 células y se determinaron los porcentajes de gMDSC por el fenotipo $CD11b^{+}/CD66b^{+}/CD14^{-}$ dentro del total de PBMC. Como control se evaluó la frecuencia de gMDSC en 15 donantes sanos pareados por edad y sexo. Como se observa en la Figura 4a, el VSSP-iMod disminuyó la frecuencia de gMDSC circulantes en los pacientes después de 21 días, o tres dosis, de iniciado el tratamiento. El estado del arte enseña que los pacientes que presentan gMDSC por debajo de la mediana, establecida para los pacientes de una localización determinada, tienen una supervivencia significativamente superior a los que tienen niveles por debajo de esta (Shipp C. y cols. (2016) Cell. Mol. Life. Sci. 73(21): 4043-61). El análisis del porcentaje de pacientes con frecuencia de gMDSC por encima y debajo de la mediana se muestra en la Figura 4b, se observa que después del tratamiento con VSSP-iMod, solo alrededor del 20% de los pacientes tratados mantuvieron elevadas las MDSC. Este resultado se mantuvo el día 147 o después del quinto mes, lo que indica que este efecto de VSSP-iMod se mantiene durante todo el tratamiento.

Se evaluó además en estos pacientes la consecuencia para la respuesta de linfocitos T, del efecto del VSSP-iMod sobre las MDSC en un experimento de proliferación mediante citometría de flujo. Se empleó como material de partida $40x10^{6}$ células provenientes del PBMC de dichos pacientes. Se purificaron las células CD11b+ mediante el empleo de perlas magnéticas conjugadas a un Ac específico por la molécula CD11b. La fracción negativa para células CD11b se marcó con CFSE y se cultivaron solas o con las células CD11b+ a una razón 5:1, durante 96 horas. En la Figura 5 se muestran los porcentajes relativos de proliferación de los linfocitos T el día 0 y el día 21 de comenzada la administración de VSSP-iMod en pacientes de RCC. Como se observa en la Figura 5a, la proliferación de los linfocitos TCD4+ se incrementa el día 21, efecto similar al que se observa en linfocitos TCD8+ (Figura 5b),

lo que significa que el VSSP-iMod es capaz de modular la capacidad supresora de la proliferación en las MDSC de los pacientes de RCC.

La mayoría de los pacientes del ensayo mostraron buena calidad de vida al terminar su tratamiento según lo establecido en el protocolo y se decidió continuar con inmunizaciones mensuales. La prolongación del tratamiento mantuvo las gMDSC por debajo de la mediana del día cero y la mediana de supervivencia del total de los pacientes de este ensayo fue de 37,5 meses (Tabla 1). Este valor es muy superior a la mediana histórica de 6,6 meses informada para pacientes similares tratados con interferón, que es el estándar actual de tratamiento en Cuba. Adicionalmente, las guías de prácticas clínicas para mRCC del *National Comprenhensive Cancer Network* (NCCN), clasifican los pacientes según los modelos del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) en bajo, mediano y mal pronóstico. Estas guías informan que, los pacientes con mRCC, tratados con terapias contra el factor de crecimiento del endotelio vascular según lo normado, tienen una mediana de supervivencia de 27 meses para los de pronóstico medio, mientras que el 75% de los de buen pronóstico se encuentran vivos a los 24 meses. La comparación relativa de estos datos con los obtenidos con VSSP-iMod indica que el efecto del VSSP-iMod sobre las gMDSC produjo también una supervivencia superior al estándar normado en las guías de NCCN. En el ensayo con VSSP-iMod el 100% de pacientes de buen pronóstico estaban vivos a los 36 meses y los de pronóstico medio tuvieron una mediana de 42 meses.

Tabla 1. Supervivencia de los pacientes de mRCC tratados con VSSP-iMod.

Paciente	Número total de dosis recibidas	Supervivencia a partir de inclusión en ensayo (meses)	Pronóstico según MSKCC a la inclusión
RCC 01	38	64.47	Bueno
RCC 02	8	5.2	Malo
RCC 03	38	64.47	Medio
RCC 04	5	2.57	Malo
RCC 05	8	30.07	Medio
RCC 06	12	37	Medio
RCC 07	2	5.9	Malo
RCC 08	16	59.37	Medio
RCC 09	16	54.07	Bueno
RCC 10	37	48	Medio
RCC 11	16	43.6	Bueno
RCC 12	41	36.5	Bueno
RCC 13	24	36.5	Medio
RCC 14	4	2.17	Malo
RCC 15	12	10.3	Malo

Ejemplo 4. El VSSP disminuye la frecuencia de MDSC de fenotipo monocítico y granulocítico en pacientes con carcinoma mamario.

El efecto del VSSP-iMod sobre las MDSC se evaluó también en pacientes con carcinoma mamario. Para ello se diseñó un ensayo Fase 0, de tipo "Ventana de Oportunidad", en el cual las pacientes recibieron 400µg de VSSP-iMod con una frecuencia semanal durante tres semanas por vía SC en la región deltoidea. Este tratamiento ocurrió en el tiempo convencional establecido entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento estándar de cirugía o quimioterapia indicado por el médico. En este ensayo se determinó por citometría de flujo la frecuencia de células G-MDSC, mMDSC y CD8, para ello se analizaron un total de 200 000 células y se determinaron los porcentajes de gMDSC y mMDSC por los fenotipos $CD11b^{+}/CD66b^{+}/CD14^{-}$ y $CD11b^{+}/CD14^{+}/HLA\text{-}DR^{bajo/neg}$, dentro del total de PBMC, respectivamente. Como se observa en la Figura 6a, el VSSP-iMod disminuyó la frecuencia de gMDSC circulantes y este mismo comportamiento se observó con las mMDSC (Figura 6b) circulantes en los pacientes, después de 21 días de tratamiento. Adicionalmente, el análisis del porcentaje de pacientes con frecuencia de gMDSCy mMDSC por encima y debajo de la mediana muestra que, después del tratamiento con VSSP-iMod, solo el 15% y 0% de los pacientes tratados mantuvieron elevadas las gMDSC y mMDSC respectivamente. Este tratamiento, también elevó la frecuencia de células T CD8+ en la sangre de los pacientes (Figura 7).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para inmunomodular la respuesta inmune en pacientes con cáncer que comprende nano-partículas formadas mediante la conjugación hidrofóbica del complejo de proteínas de membrana externa (CPME) de la bacteria *Neisseria meningitidis* al gangliósido GM3, donde la razón de conjugación entre proteína-gangliósido va desde 1,5:1 hasta 10:1.

2. La composición de la reivindicación 1 caracterizada por una distribución monomodal de volumen en un rango de 15-25 nm de tamaño de partícula, índice de polidispersión de 0.230, potencial Z negativo con valor nominal en el rango entre 25-45 mV.

3. Uso de la composición farmacéutica de las reivindicaciones 1-2 en el tratamiento del cáncer.

4. Uso de la composición farmacéutica de las reivindicaciones 1-2 como inmunomodulador de las Células Supresoras de Origen Mieloide (MDSC) en un paciente con cáncer.

5. Un método de tratamiento a un sujeto que lo necesite que comprende la administración de la composición farmacéutica según las reivindicaciones 1-2 por vía SC, intradérmica, intramuscular, intratumoral o por aplicación directa sobre mucosas con una frecuencia semanal durante al menos un total de cuatro dosis y posteriormente dosis quincenales o mensuales de mantenimiento por al menos seis meses.

6. Un método de selección de pacientes con cáncer como candidatos a recibir el tratamiento con la composición farmacéutica de las reivindicaciones 1-2 que implica:

- extraer una muestra de sangre y/o tejido tumoral del paciente y
- determinar los niveles de MDSC en dicha muestra de sangre y/o tejido tumoral.

7. El método según la reivindicación 6 donde los pacientes seleccionados son aquellos que tienen una frecuencia o número absoluto alto de MDSC en sangre.

8. El método según la reivindicación 6 donde los pacientes seleccionados son aquellos que son positivos en cuanto a su grado de infiltración de MDSC.