

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 068**

51 Int. Cl.:

A61M 1/34 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012 PCT/US2012/057749**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13085604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12855270 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2788761**

54 Título: **Reducción de niveles de galectina-3 mediante plasmaféresis**

30 Prioridad:

08.12.2011 US 201161568210 P

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

23.05.2018

73 Titular/es:

**ELIAZ THERAPEUTICS, INC (100.0%)
P.O. Box 1917
Sebastopol CA 95473, US**

72 Inventor/es:

ELIAZ, ISAAC

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 669 068 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

Reducción de niveles de galectina-3 mediante plasmaféresis

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al tratamiento de la enfermedad y las afecciones biológicas mediadas al menos en parte por una o más galectinas. Las galectinas son una familia de lectinas (proteínas de unión a azúcar) que se caracterizan por tener al menos un dominio de reconocimiento de hidratos de carbono (DRHC) con una afinidad por los beta-galactósidos. Estas proteínas fueron reconocidas como una familia solo recientemente, pero se encuentran en todo el reino animal y se encuentran en mamíferos, aves, anfibios, peces, esponjas, nematodos e incluso hongos. La presente solicitud se centra en galectinas en mamíferos y, en particular, en seres humanos. Aunque la invención
15 en el presente documento puede emplearse tanto con animales de compañía (por ejemplo, mascotas tales como perros y gatos) como con animales comerciales (tales como vacas, cerdos y ovejas) los métodos y la materia objeto abordados en el presente documento se centran en particular en el tratamiento de seres humanos.

20 Las galectinas median y modular una amplia diversidad de funciones intracelulares y extracelulares y, por tanto, tanto se expresan dentro de la célula, y con frecuencia se dirigen a un sitio citosólico específico, como se secretan desde la célula, para la distribución extracelularmente, como componentes del plasma humano. Entre las muchas funciones que están mediadas por galectinas extracelulares están la inflamación, la formación de fibrosis, la adhesión celular, la proliferación celular y la formación de metástasis (cáncer) y la inmunosupresión.

25 Las galectinas son una familia de quince (15) proteínas de unión a hidratos de carbono (lectinas) altamente conservadas en las especies animales. La mayoría de las galectinas se distribuyen ampliamente, aunque la galectina -5, -10 y -12 muestran una distribución específica de tejido. Aunque las galectinas se expresan de forma variable por todas las células inmunitarias, se regulan positivamente en linfocitos T y B activados, macrófagos inflamatorios, linfocitos citotóxicos naturales (NK) y linfocitos T reguladores FoxP3. Las galectinas contienen una
30 diversidad de disposiciones estructurales pero un dominio de reconocimiento de hidratos de carbono relativamente conservado (DRHC). La mayoría de las galectinas muestran un único DRHC y son biológicamente activas como monómeros (galectina-5, -7 y -10) o requieren la homodimerización para la actividad funcional (galectina-1, -2, -11, -13, -14 y -15). Como alternativa, las galectinas de tipo repetición en tándem (galectina-4, -8, -9 y -12) contienen dos DRHC separados por un péptido enlazador corto, mientras que la galectina-3 (tipo quimérico) tiene un único DRHC
35 fusionado con un dominio no lectina que puede formar complejo con otros monómeros de galectina-3 para formar un pentámero oligomérico. Debe señalarse, algunos galectinas, tales como la galectina-10, se unen a glicanos que contienen manosa. Entre la familia de las galectinas -1, -3 y -9 son en particular importantes como potenciales dianas terapéuticas y -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -11, -12, -13, -14 y -15 también parecen implicadas en una diversidad de vías biológicas asociadas a la morbilidad y la mortalidad.

40 Por tanto, se ha implicado a la galectina-7 en el desarrollo de ciertas formas de cáncer. St. Pierre et al, *Front. Biosci.*, 1: 17, 438-50 (2012) y en una diversidad de tipos específicos de cáncer, incluyendo gal-2, -4 y -8 en el contexto del cáncer de colon y el cáncer de mama, Barrow et al, *Clin. Cancer Res.*, 15; 17 (22) 7035-46 (2011). Se ha demostrado que el carcinoma de células escamosas de la lengua, Alves et al., *Pathol. Res. Tract.* 15; 207 (4) 236-40
45 (2011) se asocia a niveles elevados de gal-1, -3 y -7, mientras que se ha demostrado que el carcinoma escamoso del útero está vinculado a niveles de gal-7, Zhu et al, *Int. J. Cancer*, (agosto de 2012). Se ha demostrado que una serie de galectinas, incluyendo gal-15, gal-13 y gal-10 están relacionadas con problemas en la implantación y el embarazo. Véase, por ejemplo, Than et al, *Eur. J. Biochem.* 271 (6) 1065-1078 (2004), Lewis et al, *Biol. Reprod.* 77 (6); 1027-1036 (2007). Se ha identificado una serie de galectinas, incluyendo gal-2, 3, 8 y otras como
50 correlacionadas con diversos trastornos autoinmunitarios, tales como el lupus. Salwati et al, *J. Infect. Dis.* 1; 202 (1) 117-24 (2010), Pal et al, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1820 (10) 1512-1518 (2012) y Janko et al, *Lupus* 21 (7): 781-3 (2012). Niveles elevados de una serie de galectinas, incluyendo gal-3, se asocian a la inflamación y la fibrosis encontradas en la cicatrización de heridas y similares. Gal et al, *Acta. Histochem. Cytochem.* 26: 44 (5); 191-9 (2011).

55 Obviamente, la mediación de las vías inflamatorias y fibróticas hace de las galectinas elementos críticos de una amplia diversidad de fenómenos relacionados con enfermedades, lesiones y traumatismos. En muchos casos, la presencia de concentraciones no deseadas de galectinas puede agravar una condición de enfermedad o situación de traumatismo o interferir con intentos para tratar enfermedades, tales como el cáncer o la insuficiencia cardíaca congestiva. Entre la familia de galectinas reconocidas como activas intracelularmente en seres humanos, la
60 galectina-1, la galectina-3 y la galectina-9 son de particular interés. Como se ha indicado anteriormente, estas proteínas se denominan en general, y se denominan en el presente documento, gal-1, gal-3 y gal-9. Una amplia diversidad de afecciones en los seres humanos, que varían desde problemas en la concepción hasta el asma, la insuficiencia cardíaca crónica, el cáncer, la infección vírica, el ictus y demás, están mediadas o se agravan por
65 concentraciones de galectinas mayores a las normales. Por tanto, entre otras galectinas, gal-3 es particularmente prominente en la fibrosis, la inflamación y la proliferación celular, mientras que gal-1 también desempeña una

función en la inmunosupresión necesaria para un embarazo exitoso. También se cree que gal-1 está implicada en la diferenciación de las células nerviosas. Se ha demostrado que gal-9 está implicada en el control de lesiones que surgen de enfermedades inmunoinflamatorias y está implicada en general en la inflamación - gal-9 aparentemente desempeña una función en el reclutamiento de eosinófilos en sitios inflamatorios. También parece mediar la apoptosis en ciertas células activadas.

Aunque el análisis en el presente documento es aplicable a gal-1, gal-3 y gal-9 circulantes activas y galectinas en general donde los niveles elevados de galectinas circulantes se asocian a condiciones de enfermedad o lesión, se ha dilucidado más acerca del papel de gal-3 en la progresión de la enfermedad y el traumatismo que de cualquiera de las otras galectinas y, por tanto, se ejemplifica en el presente documento. Más específicamente, la presente invención se centra en la retirada de gal-3 del plasma de mamífero, en particular, de ser humano. Se ha demostrado que gal-3 está implicada en un gran número de procesos biológicos, muchos de los cuales están relacionados con patologías de diversa índole. La unión y el bloqueo de la actividad de gal-3 en la circulación o la retirada de grandes cantidades de gal-3 de la circulación pueden, por tanto, mejorar los tratamientos médicos existentes, suprimir y/o reducir la inflamación y la fibrosis resultado de otros y hacer que sea posible intervenir en diversas patologías que no se tratan fácilmente de otra forma. La invención es igualmente aplicable a la reducción de los niveles circulantes de otras galectinas para abordar afecciones mediadas por esas galectinas.

La presente invención hace uso de la plasmaféresis, a veces denominada intercambio de plasma terapéutico, para controlar los niveles de gal-3 y, más específicamente, galectina biológicamente activa, en la circulación. El plasma se conduce a través de una vía de fluido y se entremezcla con un agente de unión gal-3 que puede separarse del plasma o se devuelve al cuerpo con gal-3 inactivada bloqueada, o se conduce a través de un soporte sólido que se une gal-3, devolviéndose el plasma posteriormente al cuerpo con un nivel reducido de gal-3.

Técnica relacionada

En la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º de Serie 13/153.648 (Publicación de Patente de los EE.UU. US-2011-0294755 A1) se desvela un método de tratamiento de afecciones de proliferación celular, inflamación y fibrosis agravada, que implica la administración de un agente que puede unirse a gal-3 circulante, tal como pectina de cítricos modificada o MCP, una pectina cítrica que tiene un peso molecular reducido de veinte mil (20.000) Dalton o menos, preferentemente diez mil (10.000) Dalton o menos. MCP está disponible en el mercado de EcoNugenics de Santa Rosa, California y se analiza en las Patentes de los EE.UU. N.º 6.274.566 y 6.462.029. El documento WO 2010/065765 describe métodos, dispositivos y sistemas para la captura de biomarcadores usando dispositivos de captura por afinidad.

Antecedentes de la Tecnología

Gal-3 tiene aproximadamente 30 kDa y, como todas las galectinas, contiene un dominio de reconocimiento de unión de hidratos de carbono (DRHC) de aproximadamente ciento treinta (130) aminoácidos que permiten la unión específica de β -galactósidos. Gal-3 está codificada por un solo gen, LGALS3, localizado en el cromosoma 14, locus q21-q22. Se ha demostrado que esta proteína está implicada en un gran número de procesos biológicos. La lista que se expone en el presente documento es solamente de ejemplo, ya que se están revelando continuamente nuevas situaciones y roles para gal-3. Entre los procesos biológicos a nivel celular que se ha demostrado que están mediados, al menos en parte, por gal-3, están la adhesión celular, la migración celular, la invasión celular, la activación celular y la quimioatracción, el crecimiento y la diferenciación celulares, el ciclo celular y la apoptosis.

Dada la amplia funcionalidad biológica de gal-3, se ha demostrado que está implicada en un gran número de patologías o implicaciones médicas. Los estudios también han demostrado que la expresión de gal-3 está implicada en una diversidad de procesos asociados a la insuficiencia cardíaca, incluyendo la proliferación de miofibroblastos, la fibrogénesis, la reparación de tejidos, la inflamación y la remodelación ventricular y tisular. Se ha descubierto que niveles elevados de gal-3 en la sangre se asocian significativamente a una mayor morbilidad y mortalidad. También se ha descubierto que se asocian significativamente a un mayor riesgo de muerte en poblaciones tanto con insuficiencia cardíaca aguda descompensada como con insuficiencia cardíaca crónica.

Diversas investigaciones han demostrado que niveles elevados de gal-3 agravan una amplia diversidad de condiciones de enfermedad asociados a la proliferación celular. Los altos niveles de gal-3 están relacionados con el crecimiento del cáncer y la progresión del cáncer a una etapa metastásica en una impresionante diversidad de cánceres. Una serie de cánceres se han sido relacionado o asociado específicamente a niveles elevados de gal-3, incluyendo el cáncer de hígado, el cáncer de riñón, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de colon, el cáncer de tiroides, el cáncer de la vesícula biliar, el cáncer nasofaríngeo, la leucemia linfocítica, el cáncer de pulmón, el melanoma, el mieloma múltiple, el glioblastoma multiforme, el cáncer de útero, el cáncer de ovario, el cáncer cervical, el cáncer de cerebro y otros. También se ha demostrado que niveles elevados de gal-3 interfieren o suprimen pautas antineoplásicas convencionales, tales como tratamientos quimioterápicos como cisplatino, doxorubicina y quimioterápicos relacionados.

La inflamación es una afección corporal que se encuentra habitualmente - una respuesta natural del cuerpo a una

diversidad de enfermedades y traumatismos. Como con las otras afecciones indicadas anteriormente, los niveles de gal-3 por encima de los niveles normales están implicados en una amplia diversidad de situaciones en las que se encuentra una inflamación perjudicial. Una vez más, la lista de afecciones y patologías es demasiado extensa como para agotar todas las posibilidades, pero las afecciones inflamatorias asociadas a niveles de gal-3 elevados incluyen

5 Inflamación agravada asociada a patógenos no degradables, reacciones autoinmunitarias, alergias, exposición a la radiación ionizante, diabetes, enfermedad y disfunción cardíaca, aterosclerosis, inflamación bronquial, úlceras intestinales, inflamación intestinal de los intestinos, inflamación hepática asociada a cirrosis, inflamación asociada a infección parasitaria, inflamación asociada a infección vírica, inflamación asociada a infección fúngica, inflamación asociada a la artritis, esclerosis múltiple y psoriasis. Una vez más, aunque la inflamación es una vía empleada

10 frecuentemente por el cuerpo en respuesta a cualquier número de ataques, se ha descubierto que niveles elevados de gal-3 agravan la inflamación, provocando daños y lesiones que conducen a la morbilidad o la mortalidad en una amplia diversidad de situaciones que de otra manera son tratables, incluyendo la inflamación debido a envenenamiento por metales pesados y toxinas similares, el ictus y lesiones isquémicas relacionados, la inflamación del hígado debida al acetaminofeno, una serie de respuestas mediadas por linfocitos T generalmente implicadas en

15 enfermedades autoinmunitarias y similares. Gal-3 también está implicada en la lesión renal y la enfermedad renal, la hepatitis, la hipertensión pulmonar y la fibrosis, la diabetes y enfermedades inflamatorias gastrointestinales tales como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Chrono, la enfermedad celíaca y otros.

Como se ha señalado, los niveles elevados de gal-3 activa circulante están asociados a, y al parecer agravan, una serie de afecciones inflamatorias, incluyendo las que contribuyen a la enfermedad del corazón, el riñón, el pulmón y el hígado. Gal-3 también se asocia a una formación fibrótica, en particular en respuesta al daño de órganos. Se ha descubierto que niveles más altos de gal-3 circulante inducen fibrosis patógena en la enfermedad cardiovascular, la enfermedad gastrointestinal, el traumatismo cardiovascular, el traumatismo del tejido renal, el traumatismo cerebral, el traumatismo pulmonar, el traumatismo del tejido hepático, el daño tisular debido a la radioterapia y las

20 enfermedades y afecciones del tejido conectivo y la piel tales como la esclerosis sistémica.

En consecuencia, la técnica está repleta de observaciones de que niveles elevados de gal-3, así como gal-1 y gal-9, pueden complicar o exacerbar una amplia diversidad de condiciones de enfermedad y lesión. Sería valioso encontrar una manera de controlar la inflamación y la formación de fibrosis, donde la inflamación y la fibrosis son perjudiciales,

30 en particular en los entornos descritos anteriormente y en concreto en el cuidado cardíaco y otras enfermedades y traumatismos del tejido de órganos. Por la misma razón, sería valioso controlar las respuestas celulares mediadas por gal-3 que aceleran la proliferación y la transformación celulares, incluyendo la formación y el crecimiento de tumores, la transformación de células cancerosas y la propagación metastásica del cáncer. Otro objetivo de la técnica es evitar el problema planteado por la interferencia en el tratamiento de cáncer mediante agentes convencionales, como la bleomicina, la adriamicina, la doxorubicina, la ciclofosfamida y la ciclosporina. Algunos de los efectos secundarios provocados por estos agentes están mediados por gal-3 y pueden abordarse y mejorarse mediante la invención. Los niveles elevados de gal-3 también parecen interferir con productos farmacéuticos utilizados en otras aplicaciones, tales como el fármaco antiarrítmico amiodarona y las estatinas.

La plasmaféresis es una tecnología de separación de sangre, en la que la sangre se desvía desde el cuerpo a través de una aguja o catéter a un separador que retira las células sanguíneas y las devuelve al cuerpo, dejando un plasma. Este tipo de técnica se ha utilizado históricamente en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, en las que los anticuerpos en cuestión se retiran poniendo en contacto el plasma con los ligandos a los que se unen. Después, el plasma se aumenta según sea necesario, con anticoagulantes, agentes terapéuticos y elementos

40 asociados y se devuelve al cuerpo.

Una forma inicial de aparatos para la plasmaféresis se expone en la Patente de los EE.UU. N.º 3.625.212, que describe medidas para garantizar el retorno del plasma tratado, así como de las células sanguíneas separadas, al donante adecuado. La Patente de los EE.UU. N.º 4.531.932 aborda la plasmaféresis por centrifugación, el método utilizado para separar los eritrocitos de la sangre, de una forma rápida y casi continua. Las Patentes de los EE.UU. N.º 6.245.038 y 6.627.151 describen, cada una, una diversidad de métodos de separación de los contenidos del plasma y de devolución del plasma tratado al paciente después de retirar primero los eritrocitos, en general, para reducir la viscosidad de la sangre mediante la retirada de proteínas de alto peso molecular. Aunque la invención que es el objeto de la presente solicitud se centra en la reducción de los niveles circulantes de galectina-3 y no de las proteínas de alto peso molecular ni aborda la viscosidad directamente, pueden emplearse en general en la presente

50 invención técnicas y aparatos de plasmaféresis disponibles, como se desvelan en estas cuatro (4) las patentes.

Antes del desarrollo de la presente invención, los expertos en la materia habían experimentado con la reducción de los niveles de gal-3 en varios aspectos. Por tanto, la actividad de gal-3 en el agravamiento o la promoción del

60 cáncer, así como la capacidad de un cáncer para metastatizarse, se comenta ampliamente en la bibliografía posterior a 2006. Estos hallazgos bibliográficos subrayan reiteradamente la importancia de la unión o la reducción de la concentración circulante o el título de gal-3, y/o la inactivación de gal-3 a través de proteínas de unión de gal-3 tales como PectaSolC MCP. Véase, por ejemplo, Wang et al, *Cell Death and Disease*, 1-10 (2010) (la inhibición de gal-3 promueve el tratamiento) y Yu et al, *J. Biol. Chemistry*, Vol. 282, 1, págs. 773-781 (2007) que establecen que las interacciones de gal-3 pueden potenciar la formación de cáncer o la transformación del cáncer metastático.

65

Como se desvela y se reivindica en la Patente de los EE.UU. N.º 6.274.566, proteínas de unión de gal-3 tales como Pectina de Cítricos Modificada y otros compuestos pueden unirse a las células tumorales circulantes (CTC) y evitar la creación de nuevas metástasis. Estas CTC con frecuencia están implicadas en mutaciones y en una enfermedad más agresiva. Las células madre de cáncer, que también pueden estar circulando y ser estimuladas en condiciones de estrés e inflamación, proporcionan a gal-3 otro mecanismo para agravar el cáncer. El método de estos casos anteriores puede utilizarse junto con la invención de la presente solicitud. En particular, cuando existe un número elevado de moléculas de gal-3 circulando en el torrente sanguíneo haciendo más difícil que las proteínas de unión a gal-3 se dirijan a estas CTC. A este respecto, las moléculas de gal-3 sirven como moléculas señuelo. El señuelo previene, en esta aplicación particular de la invención, la unión de las células cancerosas en el sistema circulatorio o linfático, en oposición al nivel tisular de gal-3.

Como consecuencia, los informes vinculan la aceleración de la formación de cáncer y la transformación a concentraciones de gal-3 circulantes y sugieren que la reducción de las concentraciones circulantes de gal-3, la reducción de su expresión libre o la reducción de otra forma de la gal-3 disponible o de las interacciones de gal-3 mejora el pronóstico del cáncer. Zhao et al, *Cancer Res*, 69, 6799-6806 (2009), Zhao et al, *Molecular Cancer* 9, 154, 1-12 (2010) y Wang et al, *Am. J. of Pathology*, 174, 4, 1515-1523 (2009) en los que se demuestra que la reducción de gal-3 inducida por ARNip frena el curso del cáncer de próstata. De forma similar, la recurrencia y el pronóstico del cáncer de vejiga de alto riesgo se relacionan indirectamente con los niveles de gal-3. Rodríguez et al, *J. Curr. Opin. Urol.* 22 (5): 415-20 (2012) y Raspolini et al, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* (julio de 2012). Claramente, existe bibliografía sustancial que apoya la conclusión de que la reducción de gal-3 circulante, ya sea mediante el bloqueo de su expresión o mediante unión a la misma, es importante en el control del cáncer, tanto en el tejido como en la circulación.

Sin embargo, la gal-3 circulante está implicada empíricamente en una amplia diversidad de afecciones biológicas. La fibrosis cardíaca está ganando una atención significativa como factor de riesgo de complicación en la enfermedad cardíaca y, en particular, en la insuficiencia cardíaca crónica (ICC). Lok et al, *Clin. Res. Cardiol*, 99, 323-328 (2010). DeFillipi et al, *U.S. Cardiology*, 7,1, 3-6 (2010) indican claramente que la gal-3 circulante es un factor importante en la fibrosis de muchos órganos y sistemas de órganos y que la reducción de la gal-3 circulante puede tener un papel importante en el remedio de la lesión cardíaca y la progresión de la insuficiencia cardíaca (IC). De forma similar, Psarras et al, *Eur. Heart J.*, 26 de abril, 2011, demuestran que la reducción de los niveles de gal-3 en el miocardio puede reducir la fibrosis en el corazón y mejorar el pronóstico. De Boer et al, *Ann. Med.*, 43,1, 60-68 (2011) identifican gal-3 como un indicador clave de la salud cardíaca. Shash et al, *Eur J. Heart Fail.*, 12, 8, 826-32 (2011) identifican los niveles de gal-3 como agente clave en la insuficiencia cardíaca a través de la fibrosis. De Boer et al., *Eur J. Heart Fail.*, 11, 9, 811-817 (2009) vincula un aumento de la expresión y la presencia de gal-3 con la fibrosis aumentada y la insuficiencia cardíaca. El mismo artículo vincula gal-3 con la inflamación. La inflamación es el signo patognomónico de la arteriosclerosis y, por tanto, los niveles de gal-3 también contribuyen a la enfermedad coronaria arterial, la enfermedad de la arterial periférica, los ictus y la demencia vascular.

La fibrosis y la inflamación, ambas mediadas en cierto grado por gal-3 (celular o circulante) están implicadas en una diversidad de afecciones del cuerpo de los mamíferos, no solo la lesión cardíaca y la insuficiencia cardíaca. La unión de gal-3 conseguida mediante la administración de pectinas de bajo peso molecular (peso molecular de 10.000-20.000 Dalton, tal como PectaSol-C MCP) es eficaz en la reducción del traumatismo debido a una lesión renal. Kolatsi-Jannou et al, *PlusOne*, 6, 4, e18683 (2011). La reducción de los niveles circulantes de gal-3 puede ser eficaz en la reducción de la fibrosis en los pulmones y el asma asociada. Cederfur et al, *Biochim. Biophys. Acta.* 1820 (9):1429-1436 (2012). La reducción de los niveles circulantes de gal-3 también está indicada para reducir la inflamación asociada a la diabetes de tipo 2 y enfermedades metabólicas similares, así como la obesidad. Weigert et al, *J. Endocrinol. Metab.* 95, 3,1404-1411 (2010). Por tanto, los altos niveles de gal-3 se han relacionado con el cáncer de tiroides, Sethi et al, *J. Exp. Ther. Oncol.*, 8, 4,341-52 (2010) y la reducción de la expresión y la circulación de gal-3 puede retrasar o reducir la transformación de células tumorales. Chiu et al, *Am J. Pathol.* 176, 5, 2067-81 (2010).

Como se ha señalado, gal-3 está implicada en una amplia diversidad de afecciones biológicas y una reducción de la actividad de gal-3, tal como la que puede conseguirse mediante la unión de gal-3 con PectaSol-C MCP y pectinas de bajo peso molecular similares puede ser valiosa en el tratamiento de afecciones ulcerosas gástricas. Srikanta, *Biochimie*, 92, 2, 194-203 (2010). Kim et al, *Gastroenterology*, 138, 1035-1045 (2010) indican que la reducción de los niveles de gal-3 puede ser de valor terapéutico en la reducción de la progresión del cáncer gástrico. Por la misma metodología, la reducción de los niveles de gal-3 sensibiliza a las células de cáncer gástrico a los agentes quimioterápicos convencionales. Cheong et al, *Cancer Sci.*, 101, 1, 94-102 (2010). Gal-3 está implicada en una amplia diversidad de afecciones gastrointestinales. La reducción de gal-3, mediante la unión, por ejemplo, puede reducir la inflamación en la mucosa intestinal, haciendo de MCP un agente importante para el tratamiento de la colitis ulcerosa, la colitis no específica y la ileítis, la enfermedad de Crohn, la enfermedad celíaca y la sensibilidad al gluten. Fowler et al, *Microbiol Cell.*, 81,1,44-54 (2006).

La artrosis biliar, una enfermedad hepática, se asocia a la fibrosis extensa del hígado relacionada con niveles elevados de gal-3. Honsawek et al, *Eur. J. Pediatr. Surg.*, abril de 2011. La reducción de los niveles de gal-3 dio como resultado una mejora general en la salud hepática, incluyendo la reducción de la inflamación, de la lesión de

los hepatocitos y de la fibrosis. Federici et al, *J. Hepatol.*, 54, 5, 975-83 (2011). Véase también, Liu et al, *World J. Gastroenterol.* 14, 48, 7386-91 (2008), que notificaron, después de la enseñanza del solicitante en 2005 y 2006 para administrar MCP de bajo peso molecular, que MCP inhibió las metástasis hepáticas de cáncer de colon y redujo las concentraciones de gal-3. MCP, u otras proteínas de unión de gal-3, pueden usarse para la prevención de la inflamación del hígado, la fibrosis hepática y la cirrosis hepática, así como de daños en el hígado después de la enfermedad, incluyendo las diversas enfermedades de hepatitis víricas (A, B, C y otros) y pueden usarse también en el tratamiento de la hepatitis química y por parásitos, del daño hepático químico y otros. Los niveles de gal-3 están implicados en una amplia diversidad de dolencias asociadas al hígado. Por tanto, gal-3 puede ser importante en el control de la enfermedad de Niemann-Pick de tipo C, que es un trastorno lisosómico caracterizado por enfermedad hepática y neurodegeneración progresiva. Cluzeau et al, *Hum. Mol. Geent.* 14; 21 (16) 3632-46 (2012). Existen cada vez más pruebas de que los niveles elevados de gal-3 están relacionados con la hepatotoxicidad y la inflamación inducida por acetaminofeno. Radosavljevi et al, *Toxicol. Sci.*, 127:609-19 (2012). La reducción de los niveles de gal-3 puede mejorar los tratamientos. Dragomir et al, *Toxicol. Sci.* 127 (2): 609-19 (2012).

Aunque la administración de pectina de cítricos modificada, o un agente de unión similar, sigue siendo una terapia prometedora de inhibición del daño y de reparación del daño inducido por gal-3, el inventor ha seguido trabajando para encontrar otros métodos para proporcionar un alivio más rápido o más profundo. Ahora se ha descubierto que mediante el uso selectivo de ciertas moléculas de unión a gal-3, puede retirarse específicamente la gal-3 y, específicamente, la gal-3 biológicamente activa del plasma en cantidades significativas. El retorno del plasma con un título reducido de gal-3 activa ofrece oportunidades inmediatas para la terapia y la intervención que pueden ser diferentes de, o más profundas que, la reducción lograda por la administración de moléculas de unión a un mamífero que las necesite. Mediante la retirada de las moléculas de gal-3 circulantes la invención retira estas moléculas protectoras, pero potencialmente dañinas, de la circulación. Además, permite desarrollar bloqueantes de gal-3 dirigidos tales como MCP, y posiblemente otros oligosacáridos y diversos agentes farmacéuticos, para que se unan mejor a la gal-3 en la superficie celular y en el nivel tisular. Como la expresión de gal-3 aumenta en el tejido lesionado e inflamado, tal como el músculo cardíaco remodelado o el tejido canceroso, mediante la retirada de la gal-3 circulante, el agente de unión a gal-3 puede unirse más eficazmente a la Gal-3 en el tejido diana.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una molécula de unión a galectina-3 (gal-3) para su uso en un método de tratamiento de (a) el cáncer; o (b) la fibrosis; o (c) la inflamación dañina en un mamífero en la que el mamífero respectivamente (a) necesita la inhibición del crecimiento o la propagación del cáncer mediados al menos en parte por gal-3; o (b) necesita la inhibición del desarrollo o la extensión de la fibrosis mediada por gal-3; o (c) necesita la inhibición de la inflamación mediada por gal-3; comprendiendo dicho método:

la realización de plasmaféresis en la sangre de un mamífero que necesita la reducción de los niveles circulantes de gal-3 para reducir los niveles circulantes de gal-3 activa, en el que dicha plasmaféresis se realiza con el fin de retirar selectivamente gal-3 por contacto con dicha molécula de unión a gal-3, de manera que al menos el diez por ciento de la gal-3 circulante en el suero de dicho individuo se retire mediante dicha plasmaféresis; en el que la molécula de unión a gal-3 comprende un anticuerpo de unión a gal-3 o pectina de cítricos modificada (MCP, por sus siglas en inglés).

La invención se refiere a una molécula de gal-3 para su uso en un método de retirada de gal-3 biológicamente activa de la circulación de un mamífero mediante plasmaféresis. El mamífero puede ser un ser humano, un primate, un modelo tal como una rata o un ratón, un animal comercial tal como una vaca o cerdo o cabra o un animal de compañía tal como un perro o un gato. Los animales mamíferos no humanos para el tratamiento incluyen primates, como modelos y como bancos de ensayo para los tratamientos y la intervención que pueden beneficiarse de la retirada de gal-3 de la circulación. La retirada se consigue mediante plasmaféresis, un proceso tradicionalmente desarrollado y utilizado para retirar anticuerpos de la circulación de los que padecen trastornos autoinmunitarios y similares.

En la plasmaféresis, la sangre se retira del paciente y las células sanguíneas se separan del plasma. Las células sanguíneas se devuelven a la circulación del cuerpo, se diluyen con plasma fresco o un sustituto. Se usan métodos de plasmaféresis convencionales y medicamentos que pueden incluir diluyentes de la sangre. Aunque en la plasmaféresis típica, el plasma se hace circular sobre proteínas a las que se unen los anticuerpos diana, en este caso particular, el plasma se devuelve a la sangre con los anticuerpos, citocinas, linfocitos y otros componentes de la sangre, después de que se le haya retirado o inactivado la gal-3 selectivamente por contacto con moléculas de unión a gal-3. En el caso de enfermedades autoinmunitarias, la eliminación de la galectina-3 del plasma puede ser una terapia adyuvante añadida a la plasmaféresis tradicional realizada a dichos pacientes.

Este tratamiento puede usarse para todas las afecciones donde los niveles de gal-3 estén elevados en la sangre o suero o donde la expresión de gal-3 en los tejidos sea demasiado alta. Los tejidos arrojan el exceso de gal-3 en el torrente sanguíneo de donde puede retirarse a través de la presente invención. El tratamiento puede variarse dependiendo del paciente, de la gravedad de la afección y de la tasa de expresión de gal-3 del paciente mamífero. Habitualmente, se contempla el tratamiento cada dos a cuatro semanas hasta que se resuelva la afección, pero el

tratamiento puede ser diario cuando sea necesario o con cualquier frecuencia entre tratamientos. El tratamiento diario incluye una o más sesiones de intercambio de plasma en un día dado o plasmaféresis continua durante un periodo de múltiples horas en afecciones agudas. El tratamiento puede administrarse de forma aguda o crónica. Ventajosamente, este tratamiento se combina con la administración de bloqueantes e inhibidores de gal-3, tales como los desvelados en el documento US-2011-0294755 A1. Aunque la pectina de cítricos modificada es un inhibidor diana, pueden usarse otros inhibidores de gal-3, tales como otros hidratos de carbono modificados, incluyendo lactulosil-1-leucina, Dermotte et al, *Can. Res.* 70 (19):476-88, (octubre de 2010), así como anticuerpos específicos para gal-3 y otros antagonistas como pectina de muy bajo peso molecular con un peso tan bajo como 1 KD, GCS-100, Streetly et al, *Blood*, 115 (19): 3939-48 (publicado el 26 de febrero de 2010 como un resumen). GCS es un polisacárido derivado de MCP, en contraposición con MCP reducida. Existe una gran diversidad de anticuerpos de unión a gal-3 disponibles en el mercado, de proveedores incluyendo Abcam (ab2473), Novus Biologics (NB 100-91778) y Abgent (AJ13129). Se pueden usar otros anticuerpos específicos de galectinas-3. Mediante la retirada de grandes niveles de gal-3 activa en plasma de la sangre, la enfermedad y el daño debidos a la inflamación o la fibrosis pueden reducirse y puede evitarse la progresión del cáncer. De forma similar, los tratamientos terapéuticos convencionales pueden volverse más eficaces.

En una realización preferida, al mismo tiempo que se retira gal-3 activa, se retiran receptores de TNF solubles, R1 y/o R-2 en diferentes proporciones basándose en la afección, a través del mismo proceso, haciendo circular el fluido de plasma por encima un lecho de agentes de unión a receptores de TNF. Entonces, el TNF puede dirigirse directamente a las células cancerosas u otras dianas como un tratamiento eficaz. La reducción de gal-3 activa tanto en la circulación como a nivel tisular permitirá que el TNF ejerza sus efectos beneficiosos con una cantidad reducida de inflamación y fibrosis que limita su uso. Wu et al, *Arch. Dermatol.* 20:1-7 (2012). La retirada eficaz de gal-3 en suero también potencia la quimioterapia, en particular, pero no exclusivamente, cuando se combina con la retirada del receptor de TNF. La potenciación de la quimioterapia tendrá lugar mediante la retirada eficaz de gal-3 en suero, reduciendo la resistencia a fármacos, incluso si no se han retirado receptores de TNF de la circulación. Yamamoto-Sugitani et al, *PNAS*, 18: 108 (42), 178468-73 (2012). Gal-3 interfiere con la quimioterapia basada en platino y otros agentes antineoplásicos y aumenta la adhesión celular y la angiogénesis. Wu et al, *Oncol Cell.* 35 (3):175-80 (2012). Además, la eliminación de gal-3 por plasmaféresis sola o junto con la administración de proteína de unión a gal-3 circulante como pectina cítrica modificada de bajo peso molecular, puede tratar con eficacia las enfermedades y afecciones abordadas anteriormente. Además, esto puede potenciarse aún más mediante la combinación con otras terapias, siendo un ejemplo la quimioterapia en el cáncer.

Los promedios de nivel de gal-3 circulante típicos para un adulto de raza blanca varía desde 7 hasta aproximadamente 20 ng/ml, siendo un valor de 12-15 nanogramos de gal-3 por mililitro de suero un valor representativo y publicado. Los pacientes en riesgo, incluyendo aquellos con enfermedades avanzadas, presentan niveles, sin tratamiento, que pueden ser mucho más altos que el nivel promedio o normal de ese paciente. De acuerdo con la presente divulgación, los individuos que se enfrentan a una enfermedad grave o una discapacidad continuada debida a fibrosis mediada por gal-3, a la inflamación mediada por gal-3 y al crecimiento del cáncer, la transformación y la metástasis asociadas a niveles elevados de gal-3 se tratan por plasmaféresis para conseguir una reducción significativa en el título de gal-3 circulante.

Mediante la reducción significativa en los niveles de gal-3 circulante, pueden controlarse la inflamación y/o la fibrosis debidas a traumatismo o condición de enfermedad. Reducciones similares en los niveles de gal-3 pueden ayudar en el control del crecimiento, la extensión y la transformación de diversos tipos de cáncer. En general, una reducción de gal-3 circulante de al menos un diez por ciento (10 %) es necesaria para conseguir un progreso significativo en la fibrosis mediada por gal-3 y puede ser necesario aún más en afecciones agudas que implican inflamación, fibrosis debido a un traumatismo o cáncer agresivo. En términos funcionales, la reducción de gal-3 debe ser suficiente para reducir o inhibir el impacto de los niveles de gal-3 sobre la inflamación y la fibrosis o el crecimiento y la transformación del cáncer, en dicho paciente. Una reducción de la gal-3 circulante de al menos el veinte por ciento (20 %) y en algunos casos de al menos el cuarenta por ciento (40 %) o incluso el cincuenta por ciento (50 %), puede ser necesaria de forma sostenida. Situaciones graves pueden requerir una reducción en los niveles de gal-3 circulante en un paciente mamífero de más del cincuenta por ciento (50 %) del título de gal-3 circulante de ese paciente, y de hasta un setenta y cinco por ciento (75 %) o incluso más. Aunque se requiere cierto nivel de gal-3 en la circulación para la homeostasis, en situaciones agudas, pueden ser necesarias reducciones de al menos un ochenta por ciento (80 %) de gal-3 circulante, y hasta la retirada casi total de gal-3 del suero, ya que ese nivel se repone rápidamente por el cuerpo. Pueden encontrarse situaciones agudas en todas las clases de individuos, pero un ejemplo representativo es la inflamación hepática o la transformación en un cáncer agresivo como el cáncer de páncreas o el carcinoma de pulmón microcítico.

Los niveles de gal-3 en razas distintas de la raza blanca y entre sujetos pueden variar, pero el objetivo es reducir los niveles de gal-3 por debajo del valor normal correspondiente. Los niveles objetivo pueden variar en función de la condición, edad, sexo y otras terapias implicadas. Como cuestión general, el tratamiento del paciente puede comenzar con plasmaféresis diseñada para reducir la gal-3 del paciente a un valor preseleccionado coherente con la buena salud y la homeostasis en ese individuo. En algunos casos, puede ser necesario repetir o prolongar el tratamiento para lograr reducciones aún mayores.

La presente invención es sencilla en su aplicación. Lo complejo y sorprendente es reconocer para cuántas indicaciones diferentes sirve esta tecnología. La sangre se retira del paciente de acuerdo con protocolos bien establecidas utilizados generalmente para plasmaféresis. Véase, en general, Samuels et al, editores, *Office Practice of Neurology*, 1996. La sangre extraída se trata para retirar las células sanguíneas del plasma. Estas células sanguíneas, junto con un volumen adicional de plasma o plasma sustituto, se devuelven directamente al paciente. En una sesión única, pueden retirarse, filtrarse y reemplazarse de dos a cuatro litros de plasma. La sangre también puede reciclarse y recircular extracorporalmente y filtrarse, según sea necesario, una serie de veces (de forma continua) hasta que se consiga la reducción deseada de los niveles séricos de galectina-3. Pueden buscarse diferentes niveles séricos para diferentes afecciones. Después, el plasma agotado de células sanguíneas se introduce en una cámara en la que gal-3 se retira o se inactiva mediante un antagonista de la unión, posiblemente creando una unión permanente que inactiva la gal-3. Puede usarse una de dos medidas alternativas para retirar gal-3, aunque pueden combinarse. En una primera alternativa, el plasma se mezcla con una partícula que se une a gal-3. Preferentemente, ésta es un anticuerpo o ligando similar, o un derivado de polisacárido que más preferentemente pectina de cítricos modificada (MCP), pero puede usarse cualquier agente que pueda unirse a gal-3. Se conocen en la técnica métodos de preparación de pectinas de bajo peso molecular y se exponen en el documento U.S.-2011-0294755 A1.

El agente de unión se modifica para que forme complejo con un agente que se retire fácilmente. En una realización, éste es una partícula magnética. Después de proporcionar el tiempo de circulación adecuado, se aplica un campo magnético al fluido que comprende el plasma y el complejo de MCP y la gal-3 unida puede extraerse. Pueden usarse diferentes filtros que incorporan proteínas de unión a gal-3 en el proceso de plasmaféresis.

En ciertas condiciones, tales como el cáncer, la gal-3 circulante puede verse como una especie de señuelo liberado por las células cancerosas. Tiene una cualidad protectora, ya que no permite el hospedador, ni permite que las proteínas de unión a gal-3 tales como MCP, alcancen el tejido diana en el que se sobre expresa la galectina-3. También induce la inflamación y fibrosis y hace que sea más difícil para el hospedador unirse a la gal-3 a nivel tisular y de la superficie celular. La extracción de gal-3 de la circulación proporciona un tratamiento terapéutico por sí misma y permite que otros agentes se unan e inactiven la gal-3 en el nivel de tejido diana. Esto es similar a TNF alfa y a los receptores de TNF alfa circulantes. Dicha plasmaféresis puede combinarse con la plasmaféresis de otros compuestos y puede potenciar una respuesta inmunitaria y una respuesta antiinflamatoria. La reducción de gal-3 circulante permitirá que un experto en la materia, normalmente un médico con al menos cinco (5) años de experiencia en el campo, además una experiencia educativa apropiada, neutralice e inactiva la gal-3 expresada en el tejido más fácilmente, permitiendo de este modo una respuesta inmunitaria local con menos inflamación y fibrosis. Como tal, puede combinarse con la retirada de los receptores de TNF alfa, tanto R-1 y R-2. También puede combinarse con la administración de TNF alfa o agentes que potencien la actividad de TNF alfa.

La retirada o la reducción del nivel de galectina-3 circulante puede reducir el proceso inflamatorio sistémico y no deseado, dando como resultado, como se ha demostrado en el estudio de MCP en riñón, con reducción en los niveles de IL-6 y, en consecuencia, TNF alfa y TNF Kapa Beta.

En consecuencia, el método desvelado en el presente documento funciona en dos (2) niveles:

1. Reducción directa de la gal-3 circulante; y
2. Capacidad de dirigir mejor la gal-3 a nivel tisular.

Esto tiene varias consecuencias en términos de eficacia del tratamiento:

1. Mediante la reducción de la gal-3 circulante, puede haber un mayor derramamiento de la gal-3 tisular a través de una mayor diferencia de gradiente, dando como resultado una reducción de la inflamación, la fibrosis y la remodelación a nivel tisular.
2. Reducción de citocinas proinflamatorias secundarias tales como IL-6, TNF alfa, TNF Kapa beta y otras.
3. Puede permitir una mayor eficacia de diversos bloqueantes de gal-3 circulantes en general y, específicamente, de MCP y poliuronidos inferiores a 40K Dalton.
4. Puede aumentar la eficacia de otras terapias que se inhiben por la excesiva circulación de gal-3.

En una realización alternativa, el plasma que comprende gal-3 puede hacerse circular a través de una fase sólida de agentes de unión a gal-3 inmovilizados. MCP es un ejemplo y anticuerpos específicos de gal-3, unidos a una columna o tubo, son otro. En las realizaciones preferidas, estos dos enfoques se combinan para la retirada de gal-3 de la circulación. Éstos pueden combinarse en cualquier orden, pero se prefiere hacer circular el plasma a través de una fase inmóvil, seguido de la combinación del plasma con un agente de unión fácilmente retirable. Como alternativa la unión de un antagonista de gal-3 puede ser adecuado inactivar la molécula y, por tanto, puede devolverse al cuerpo sin la etapa de retirarla del plasma.

La unión de gal-3 por un elemento de plasmaféresis que la retire de la circulación es un evento que ayudará a afecciones médicas en una amplia diversidad de indicaciones. En una escala amplia, las indicaciones se asocian principalmente a la inhibición del crecimiento y la transformación tumorales (cáncer), la inflamación y fibrosis. Éstos

están implicados en indicaciones específicas tales como, enfermedades cardíacas, daño renal, daño hepático y enfermedades hepáticas y renales, enfermedades de la vejiga, enfermedades de la tiroides, enfermedades pulmonares, enfermedades gastrointestinales, respuesta inmunitaria, ictus, inflamación aguda persistente debido a patógenos no degradables, organismos extraños persistentes, reacciones autoinmunitarias, hipersensibilidades y alergias, pesticidas, toxinas ambientales y metales pesados, así como afecciones heterogéneas tales como radiación (siendo ejemplos procedimientos médicos tales como diversas radioterapias, exposición a la radiación ionizante, radiación nuclear, radiación cósmica, radiación electromagnética), daño por quimioterapia e inflamación y fibrosis post radiación e inducidas por quimioterapia, aumento postquirúrgico de la inflamación, traumatismos agudos tales como accidentes y otros.

La gal-3 circulante elevada puede cambiar una situación localizada, tales como la inflamación o la fibrosis localizadas y convertirla en un problema sistémico mayor. Por tanto, cuando gal-3 se une a los componentes de la sangre, que también se unen a agentes tóxicos y similares, o, de forma similar, cuando las toxinas localizadas están unidas por gal-3, el daño provocado potencialmente por estos agentes próximo a una lesión localizada o tejido enfermo puede volverse sistémico. El mismo fenómeno se observa en relación con el cáncer potencialmente metastásico. Gal-3 es una molécula generalmente adhesiva. Los niveles elevados de gal-3 acelerarán la propagación del cáncer desde un tumor localizado a uno problema sistémico, de múltiples órganos. La reducción de los niveles elevados de gal-3 por debajo de 15 o 12 ng/ml, en un diez por ciento (10 %) o más, ayudará a localizar lesiones y daños y maximizar el beneficio de agentes terapéuticos no relacionados en la lesión local o sitio de la enfermedad.

Como se ha señalado anteriormente, los niveles elevados de gal-3 se asocian al crecimiento, la transformación y la migración metastásica de las células cancerosas en una amplia diversidad de cánceres, incluyendo el cáncer de hígado, el cáncer de riñón, el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de colon, el cáncer de tiroides, el cáncer de la vesícula biliar, el cáncer nasofaríngeo, la leucemia linfocítica, el cáncer de pulmón, el melanoma, el mieloma múltiple, el glioblastoma multiforme, el cáncer de útero, el cáncer de ovario, el cáncer cervical y el cáncer del cerebro entre otros, así como a la reducción de la sensibilidad en estos cánceres a los agentes antineoplásicos convencionales.

Los niveles elevados de gal-3 también se asocian al desarrollo y la extensión de la fibrosis más allá de los niveles normales y saludables, en las situaciones asociadas a la enfermedad cardiovascular y la insuficiencia cardíaca, en la lesión de tejidos incluyendo situaciones del cerebro, de los pulmones, renales, hepáticas, cardíacas y gastrointestinales, así como en el daño tisular debido a la radiación y la exposición a la quimioterapia.

También se encuentran niveles de gal-3 por encima de lo normal en relación con la inflamación. Esto puede ser inflamación asociada a enfermedad o traumatismo, así como inflamación aguda persistente debida a patógenos no degradables, cuerpos extraños persistentes o reacciones autoinmunitarias, hipersensibilidades y alergias, radiación ionizante, radiación nuclear e inflamación que pueden estar asociada a enfermedad o modos de insuficiencia de órganos, incluyendo la diabetes (I y II), la enfermedad y la disfunción cardíacas, la aterosclerosis, el asma (inflamación bronquial), las úlceras gástricas y duodenales, la inflamación intestinal (enfermedades inflamatorias intestinales), la inflamación hepática asociada a la cirrosis y la inflamación tanto relacionadas como no relacionadas con el alcohol, infecciones del hígado tales como hepatitis vírica, entre otros. Otras indicaciones asociadas a la inflamación y susceptibles de tratamiento mediante tratamiento por plasmaféresis para reducir los niveles de gal-3 incluyen una diversidad de afecciones inducidas por parásitos, tales como la tripanosomiasis, la malaria cerebral y la inflamación y la resistencia a diversas infecciones incluyendo *Paracoccidiosis brasiliensis* (infección por hongos), la esquistosomiasis, bronconeumonía granulomatosa, la enfermedad de Lyme, la tuberculosis, etc. Los informes de niveles de gal-3 elevados en relación con la infección incluyen *Candida albicans*, Reales-Calderon et al, *J. proteómica*, 3: 75 (15) 4734-46 (2012), *Schistoma mansoni* (una infección parasitaria) Marca et al, *Histol. Histopathol.*, 27 (8) 1109-1120 (2012) y muchos otros, incluyendo infecciones bacterianas como *Neisseria meningitidis*, Quattroni et al, *Microbiol Cell.*, (julio de 2012). La infección por priones, en la enfermedad del SNC, también se ha vinculado a niveles elevados de gal-3. Mok et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3: 359: 672-8 (2007). Los niveles elevados de gal-3 son un factor importante que contribuye a la inflamación asociada a la artritis, la esclerosis múltiple, el Parkinson, otras dolencias neurológicas; y otras enfermedades de los sistemas locomotor y la piel, incluyendo afecciones relacionadas con inflamación y fibrosis tales como la psoriasis y el envejecimiento de la piel. Véase, por ejemplo, Ezzat et al, *Int. J. Rheum. Dis.*, 14 (4): 345-52 (2011) (artritis), Gal et al, *Acta. Histochem. Cytochem.*, 44 (5): 191-9 (2011) y Liu et al, *Invest. Dermatol.*, 10, 1038 (2012) (cicatrización de heridas) y Larsen et al, *Dermatol. Sci.*, 64 (2): 85-91 (2011) (enfermedades de la piel). Como se ha señalado anteriormente, estas afecciones pueden tratarse mediante la retirada de gal-3 no unida, biológicamente activa, de la circulación mediante el uso de la presente invención sola o mediante la retirada de la circulación combinada con la administración de agentes proteínas de unión a gal-3 tales como MCP para abordar adicionalmente afecciones mediadas por gal-3.

La inflamación mediada al menos en parte por los niveles circulantes de gal-3 también desempeña una función en trastornos psiquiátricos y cerebrales orgánicos. Este tipo de inflamación se ha asociado a una amplia diversidad de afecciones, tales como la esquizofrenia. Muller et al., *Adv. Protein Chem Struct. Biol.*, 88, 49-68 (2012) y Palladino et al, *J. Neuroinflammation*, 22; 9, 206 (2012). Por tanto, la reducción de los niveles elevados de gal-3 puede ser un método para ayudar en el control de los trastornos psiquiátricos de este tipo que son difíciles de controlar mediante

la intervención terapéutica sola. De forma similar, se ha demostrado que una afección que recibe cada vez más atención, el trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH), está mediada en cierto grado por la expresión de gal-3. Wu et al, *Brain Pathol.*, 20 (6), 1042-1054 (2010). Los niveles de expresión gal-3 elevados y la inflamación asociada a los mismos, también se han relacionado con el daño tisular orgánico, así como con

5 trastornos conductuales psiquiátricos. Por tanto, se ha demostrado que la enfermedad de Alzheimer y los depósitos de A β amiloides potenciados se asocian a afecciones proinflamatorias, tales como las mediadas por niveles elevados de gal-3. Reale, et al, *Curr. Alzheimer Res.* 9 (4), 447-57 (2012). También se ha demostrado que gal-3 está implicada en la diferenciación correcta de los oligodendrocitos que controlan las afecciones de la vaina de mielina, Pasquin et al, *Cell Death Differ.*, 18 (11), 1746-1756 (2012) y la recuperación y la regeneración después del

10 traumatismo craneoencefálico. Venkatesan et al, *J. Neuroinflammation* 27 (7) 32 (2010). Por tanto, además de ser de importancia en el control de la inflamación en condiciones de enfermedad o lesiones en general, la reducción de los niveles circulantes de gal-3 través de plasmaféresis puede tener un valor crítico en el control de los fenómenos físicos asociado a los trastornos del cerebro y del sistema nervioso central.

15 Cabe señalar que habitualmente, la inflamación y la fibrosis pueden inducirse mediante tratamiento deliberado, no solo por traumatismo o condición de enfermedad. La retirada de la gal-3 no unida, circulante, a través del uso de la presente invención puede ser eficaz para reducir o prevenir el daño de órganos inducido por quimioterapia y otros productos farmacéuticos. Algunos ejemplos incluyen la bleomicina, que induce fibrosis pulmonar y una amplia diversidad de fármacos cardíacos tales como amiodarona. La adriamicina y la doxorubicina se prescriben

20 ampliamente y presentan inflamación cardíaca y problemas de fibrosis. Los lavados con bacilo de Calmette-Guerin para tratar el cáncer de vejiga inducen la inflamación sistémica y la ciclofosfamida también induce daño de la vejiga. La ciclosporina, un fármaco inmunosupresor ampliamente utilizado y el agente activo en RestasisTM, induce toxicidad e inflamación renales. Los estudios indican que la gran diversidad de daños en los órganos provocados por productos farmacéuticos prescritos está mediada, al menos en parte, por niveles elevados de gal-3 y puede limitarse, si no eliminarse, mediante el uso de la presente invención.

25

En una realización preferida, el suero, después de haberse reducido o retirado la gal-3 circulante, como se ha descrito, se trata adicionalmente antes de devolverlo al torrente sanguíneo del paciente. Específicamente, se añaden específicamente agentes que pueden ser más eficaces en ausencia o en presencia de niveles reducidos de galectina-3. Esto incluye una amplia diversidad de agentes activos, pero incluye específicamente agentes tales como

30 fármacos quimioterápicos y agentes terapéuticos para las diversas afecciones. Por ejemplo, un antiinflamatorio funcionará mejor, medicamentos cardíacos, cualquier fármaco entregado para abordar un problema en el que la gal-3 es un factor contribuyente, o impide la entrega eficaz al tejido diana, se potenciarán mediante este proceso. Estos agentes tendrán entonces la oportunidad de funcionar en un entorno de niveles más bajos de gal-3. Aunque solo sea durante unas pocas horas, pueden presentar una actividad biológica completa. Una vez que la inflamación, por ejemplo, se reduce, se produce y se expresa menos gal-3 de forma natural por el tejido diana, dando como resultado un menos gal-3 circulante a largo plazo.

35

Por tanto, aunque en una alternativa, el uso de la invención implica plasmaféresis a largo plazo o crónica para mantener niveles reducidos de gal-3, la invención también contempla la intervención a corto plazo, tanto retirando gal-3 circulante como proporcionando agentes de otro modo inhibidos por gal-3, para abordar rápidamente la inflamación en particular. Los niveles de gal-3 pueden alcanzar un pico como un evento transitorio, en respuesta a un traumatismo, por ejemplo. Tener una técnica para disminuir rápidamente los niveles de gal-3 en el paciente, junto con la administración de agentes activos que normalmente son inhibidos en cierto grado por altos niveles de gal-3,

40 puede ofrecer una técnica que salve vidas.

45

Aunque solicitante no desea quedar confinado a estos pocos ejemplos, se ha demostrado que un gran número de afecciones están mediadas por gal-3 no unida, de manera que su retirada, mediante el método desvelado en el presente documento, ayudará en el tratamiento. Se ha demostrado que la reducción de la gal-3 libre en seres humanos puede prevenir la fibrosis renal y la inflamación después de una lesión renal. Se ha demostrado que el tratamiento tanto del cáncer de tiroides como del cáncer de pulmón mejora eficazmente mediante la reducción de las concentraciones de gal-3. Puede conseguirse una sensibilidad potenciada tanto a la radiación como a la intervención quimioterapéutica mediante la reducción de los niveles circulantes de gal-3 activa a través de la presente invención.

50

El asma y afecciones relacionadas principalmente marcadas por la inflamación exagerada pueden evitarse o suprimirse mediante la retirada de la gal-3 circulante a través del uso de la presente invención. Éstas incluyen la inflamación del tracto gastrointestinal y la inflamación y el desarrollo de fibrosis del hígado, la cistitis intersticial, la inflamación asociada al cerebro y la función cognitiva y otros. La inflamación asociada a la invasión por parásitos también puede controlarse mediante la retirada de gal-3 o la reducción de sus niveles circulantes a través del uso de

55 la presente invención. Otras enfermedades asociadas a la inflamación, tales como la diabetes y la artritis se tratan de manera similar. Estas afecciones pueden ser, idealmente, dianas de la presente invención, así como la administración de agentes de unión a gal-3 circulante como MCP y agentes terapéuticos no relacionados.

60

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión a galectina-3 (gal-3) para su uso en un método de tratamiento (a) del cáncer; o (b) de la fibrosis; o (c) de la inflamación dañina en un mamífero en el que el mamífero, respectivamente, (a) necesita la inhibición del crecimiento o la propagación del cáncer mediados al menos en parte por gal-3; o (b) necesita la inhibición del desarrollo o la extensión de la fibrosis mediada por gal-3; o (c) necesita la inhibición de la inflamación mediada por gal-3; comprendiendo dicho método:
- la realización de plasmaféresis en la sangre de un mamífero que necesita la reducción de los niveles circulantes de gal-3 para reducir los niveles circulantes de gal-3 activa, en el que dicha plasmaféresis se realiza con el fin de retirar selectivamente gal-3 por contacto con dicha molécula de unión a gal-3, de manera que al menos el diez por ciento de la gal-3 circulante en el suero de dicho individuo se retire mediante dicha plasmaféresis; en el que la molécula de unión a gal-3 comprende un anticuerpo de unión a gal-3 o pectina de cítricos modificada (MCP).
2. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicho método comprende adicionalmente el seguimiento periódico del nivel de gal-3 circulante en dicho mamífero y la repetición de dicha plasmaféresis en dicho mamífero cuando dicho nivel de gal-3 esté por encima de un nivel preseleccionado de gal-3 para dicho individuo coherente con la patología mediada por gal-3 de ese individuo.
3. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que el nivel circulante de gal-3 en dicho mamífero se reduce en al menos, el veinticinco por ciento (25 %).
4. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que el nivel circulante de gal-3 se reduce mediante dicha plasmaféresis en aproximadamente el cincuenta por ciento (50 %) del nivel de gal-3 antes de dicha plasmaféresis.
5. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que el nivel de gal-3 circulante de dicho individuo se reduce mediante dicho método en al menos el setenta y cinco por ciento (75 %).
6. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicha etapa de realización de plasmaféresis comprende desviar una porción de sangre de dicho mamífero desde el cuerpo de dicho mamífero para proporcionar un volumen de sangre separada, retirar los eritrocitos de dicha sangre separada para proporcionar plasma separado y devolver dichos eritrocitos a la circulación de dicho mamífero, poner en contacto dicho plasma separado con la molécula de unión a gal-3, y separar cualquiera de dicha molécula de unión a gal-3 y gal-3 unida a la misma del resto de dicho plasma separado para proporcionar un plasma con niveles reducidos de gal-3, y devolver dicho plasma separado con niveles reducidos de gal-3 a la circulación de dicho mamífero.
7. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 6, en la que dicha molécula de unión a gal-3 comprende un anticuerpo que se une gal-3, o en la que dicha molécula de unión a gal-3 se conjuga con un elemento que hace más fácil la separación de dicha molécula de unión a gal-3 y, cualquiera gal-3 unida de este modo, de dicho plasma separado, en la que dicho elemento es una columna a la se fija dicha molécula de unión gal-3, un armazón al que se fija una serie de dichas moléculas de unión a gal-3, partículas magnéticamente atraíbles o una mezcla de los mismos.
8. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 3, en la que, tras la devolución de dicho plasma separado a dicho mamífero, el nivel de gal-3 circulante en dicho mamífero es inferior a 15 ng/ml.
9. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicho cáncer es cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de la vesícula biliar, cáncer nasofaríngeo, leucemia linfocítica, cáncer de pulmón, melanoma, mieloma múltiple, glioblastoma multiforme, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer cervical o cáncer de cerebro.
10. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicho mamífero está recibiendo quimioterapia antineoplásica para el cáncer cuya terapia es inhibida por gal-3.
11. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dichas fibrosis se asocian a enfermedad cardiovascular, enfermedad gastrointestinal, traumatismo cardiovascular, traumatismo cerebral, traumatismo pulmonar, traumatismo del tejido renal, traumatismo del tejido hepático, daño tisular debido a radioterapia o daños tisular debido a quimioterapia.
12. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicha inflamación:
- (a) se debe a la terapia farmacéutica, en la que dicha farmacéutica comprende preferentemente bleomicina, amidoarona, Adriamicina, doxorubicina, ciclofosfamida y ciclosporina; o
- (b) es: asociada a patógenos no degradables, reacciones autoinmunitarias, alergias, radiación ionizante,

- radiación nuclear, diabetes, enfermedad o disfunción cardíaca, aterosclerosis; inflamación bronquial; úlceras intestinales; inflamación intestinal; inflamación hepática; cirrosis asociada a inflamación hepática; inflamación asociada a infección parasitaria; inflamación asociada a infección vírica; inflamación asociada a infección por hongos; inflamación asociada a infección bacteriana; inflamación asociada a artritis; inflamación asociada a trastornos orgánicos psiquiátricos o del cerebro, esclerosis múltiple o psoriasis.
- 5
13. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicho mamífero necesita la reducción de los niveles de gal-3 con el fin de mejorar la eficacia de un producto farmacéutico que se ha de administrar a dicho individuo, en la que dicho producto farmacéutico es preferentemente una estatina, un agente químico antineoplásico, un agente antiinflamatorio, un bloqueante de TNF o un promotor de la actividad de TNF α .
- 10
14. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que antes de que devuelva dicho suero a dicho individuo éste se mezcla con un agente antineoplásico o un agente antiinflamatorio.
- 15
15. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la molécula de unión a gal-3 es pectina de cítricos modificada (MCP).
16. Una molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en la que dicha plasmaféresis se realiza con el fin de retirar selectivamente el receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) soluble en combinación con la retirada selectiva de dicha gal-3 mediante dicha plasmaféresis.
- 20
17. La molécula de unión a gal-3 para su uso de acuerdo con la Reivindicación 16, en la que dicho receptor de TNF es R-1 y/o R-2 y dicha plasmaféresis comprende hacer circular fluido de plasma sobre un lecho de agente de unión de dicho receptor de TNF.