

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 386**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/715** (2006.01)  
**C07H 3/00** (2006.01)  
**A61K 31/70** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/US2012/055311**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13101314**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12863426 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2797942**

54 Título: **Composición de un nuevo fármaco de carbohidratos para el tratamiento de enfermedades humanas**

30 Prioridad:

**28.12.2011 US 201161580830 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.02.2019**

73 Titular/es:

**GALECTIN THERAPEUTICS INC. (100.0%)  
4960 Peachtree Industrial Blvd. Suite 240  
Norcross, GA 30071, US**

72 Inventor/es:

**ZOMER, ELIEZER;  
TRABER, PETER G.;  
KLYOSOV, ANATOLE A. y  
CHEKHOVA, ELENA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 699 386 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

Composición de un nuevo fármaco de carbohidratos para el tratamiento de enfermedades humanas

### Aplicaciones relacionadas

5 Esta solicitud reclama el beneficio y la prioridad de la Solicitud provisional de E.E.U.U. con N° de serie 61/580.830, presentada el 28 de diciembre de 2011.

### Campo de la invención

10 Los aspectos de la invención se refieren a un polisacárido de calidad farmacéutica y a sus composiciones farmacéuticas. Otros aspectos de la descripción se refieren a métodos de tratamiento de enfermedades, como las afecciones médicas relacionadas con inflamación y fibrosis y ligadas a cáncer, al menos en parte, a la expresión aberrante o aumentada de proteínas de galectina, que usa estos compuestos y composiciones.

### Antecedentes de la invención

15 Las plantas y los productos vegetales se han usado durante muchos años para derivar productos farmacéuticos, a menudo en forma de moléculas orgánicas complejas específicas que tienen una función fisiológica en animales y seres humanos. Además de las moléculas específicas individuales, se han explorado los componentes estructurales de la célula vegetal, que son moléculas grandes y complejas de carbohidratos, en busca de diversos efectos en animales y seres humanos en la fisiología normal y la enfermedad. Entre los carbohidratos complejos que forman las paredes celulares de las células vegetales, las pectinas representan una clase de moléculas que han sido ampliamente examinadas.

20 Con el fin de evaluar el efecto de las pectinas en la circulación sistémica y en los órganos de animales y seres humanos, se han hecho intentos para desarrollar pectinas modificadas que podrían utilizarse como compuestos medicinales.

25 Por consiguiente, existe la necesidad de proporcionar pectinas modificadas y un método para fabricar pectinas modificadas para usar como compuestos medicinales parenterales o enterales. Además, existe la necesidad de que estos compuestos tengan las propiedades farmacológicas requeridas para inhibir la inflamación y la fibrosis mientras permanecen no tóxico para otras células y tejidos.

El documento US2008/107622 describe métodos y composiciones para reducir la fibrosis y la cirrosis.

### Resumen de la invención

30 La invención es tal como se define en las reivindicaciones. Los aspectos de la invención se refieren a un compuesto o composición que comprende un compuesto en un vehículo farmacéutico aceptable para administración parenteral o enteral, para usar en formulaciones terapéuticas.

35 En algunas realizaciones, el compuesto es un polisacárido y puede definirse químicamente como arabinogalactoramnogalacturonano (en esta memoria denominado como Compuesto G), un heteropolímero ramificado, selectivamente despolimerizado cuyo esqueleto está compuesto predominantemente de residuos de ácido galacturónico (GalA) ligados 1,4 y de metil galacturonato (MeGalA), con una composición de esqueleto menor de GalA ligados 1,4 y ramnosa (Rha) ligada 1,2 alternantes, que a su vez está ligada a cualquier número de cadenas laterales de oligómeros, que incluyen predominantemente residuos de 1,4-β-D-galactosa (Gal), 1,5-α-L-arabinosa (Ara) o combinaciones de los mismos. Otros constituyentes menores de la cadena lateral pueden incluir xilosa (Xyl), glucosa (Glu), fucosa (Fuc) o cualquier combinación de los anteriores.

40 El compuesto de arabinogalacto-ramnogalacturonano de la presente invención (Compuesto G) es capaz de reducir la secreción de la citoquina TNF-alfa a partir de monocitos estresados con endotoxina. En algunas realizaciones, el compuesto G es capaz de reducir la secreción de TNF alfa por macrófagos activados en al menos un 25%.

45 En algunas realizaciones, el esqueleto de residuos de ácido galacturónico ligado 1,4 y metil galacturonato puede representar entre el 55 y 85 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, el heteropolímero ramificado de residuos alternantes de ramnosa ligada α-1,2 y GalA ligada α-1,4 pueden representar entre el 1 y el 6 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, el oligómero de 1,4-β-D-galactosa de la ramificación primaria puede representar entre el 6 y el 15 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos y el oligómero 1,5-α-L-arabinosa de la ramificación primaria puede representar entre el 2 y el 8 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, según se caracteriza mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas.

50 El oligómero de residuos de 1,4-β-D-galactosa, residuos de 1,5-α-L-arabinosa o combinaciones de los mismos representa al menos el 8 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos.

En algunas realizaciones, los residuos de 1,4-β-D-galactosa y los residuos de 1,5-α-L-arabinosa están presentes en una proporción 2:1 o una 3:1 en el compuesto de arabinogalacto-ramnogalacturonano de la presente descripción.

El compuesto de la presente invención tiene un grado de metoxilación que varía entre el 40% y el 70% del máximo del 87%.

- 5 El compuesto de la presente invención tiene una proporción de metil galacturonato a ácido galacturónico que varía de 2:1 a 1:2.

En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención tiene una proporción de metil galacturonato más ácido galacturónico a galactosa que varía de 4:1 a 7:1.

- 10 En algunas realizaciones, el porcentaje molar de los residuos de 1,4-β-D-Gal y de 1,5-α-L-Ara en el compuesto de la presente invención puede exceder el 10% de los carbohidratos molares totales con una proporción aproximada que varía de 1:1 a 3:1 respectivamente.

- 15 En algunas realizaciones, el compuesto es un polisacárido químicamente definido como galactoarabino-ramnogalacturonato (Compuesto G), un heteropolímero ramificado con una distribución de peso molecular promedio de 2.000 a 80.000, o de 20.000 a 70.000, o de 5.000 a 55.000 Daltons, según lo determinado por SEC-RI y/o el método SEC-MALLS.

En algunas realizaciones, el compuesto puede ser un polisacárido modificado altamente soluble suficientemente reducido en peso molecular promedio, por ejemplo, de 2.000 a 80.000 D, para ser compatible con formulaciones terapéuticas para administración pluralista a través de rutas que incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, subcutánea, intra-articular, por inhalación, y oral.

- 20 En algunas realizaciones, el compuesto puede estar sustancialmente libre de endotoxinas microbianas, pesticidas agrícolas, herbicidas agrícolas, cobre, metales pesados, proteínas, compuestos nitrogenados o cualquier combinación de los anteriores.

- 25 En algunas realizaciones, el compuesto se puede sintetizar a partir de pectina USP natural, altamente ramificada, mínimamente procesada y altamente metoxilada que puede provenir de cualquier fuente vegetal, que incluye, pero no se limita a, frutos cítricos, manzana o remolacha.

En algunas realizaciones, el compuesto se puede sintetizar a partir de pectina USP natural, altamente ramificada, mínimamente procesada y altamente metoxilada como la fabricada a partir de pulpa de manzana que contiene 8-12% de pectina.

- 30 En algunas realizaciones, el compuesto se puede sintetizar bajo una hidrólisis suficientemente controlada y específica de la GalA ligada α-1,4, metoxilada ligada con enlaces glicosídicos mientras que se preservan las cadenas laterales con cantidades enriquecidas de 1,4-β-D-Gal y de 1,5-α-L-Ara. Se pueden determinar cuantitativamente las cantidades de 1,4-β-D-Gal y de 1,5-α-L-Ara mediante los métodos GC-MS (Cromatografía de gases-espectrometría de masas) y AELC-PAD (cromatografía líquida de intercambio aniónico- detector de amperometría pulsada).

- 35 En algunas realizaciones, el compuesto se puede producir mediante un proceso que comprende despolimerización catabolizada mediante escisión dirigida por peroxidación de enlaces glicosídicos por OH ionizado super-generado a partir de ácido ascórbico y/o peróxido en presencia o ausencia de una forma reducida adicional de un ion de metal de transición, como Cu sup.++ de 1 a 100 mM. Se pueden usar otros metales de transición como Ca sup.++ o Fe sup.++ para este propósito.

- 40 En algunas realizaciones, el compuesto despolimerizado se puede exponer a un pH de entre 8 a 10 durante 10 a 30 minutos a una temperatura de 2° a 60°C para iniciar una desmetoxilación limitada controlada para generar un compuesto despolimerizado con un grado de metoxilación de 40 a 70 por ciento en comparación con los niveles iniciales de un máximo del 87% y se puede denominar compuesto metoxilado medio. La metoxilación completa del ácido galacturónico se considera que es de aproximadamente DE 87%.

- 45 En algunas realizaciones, la composición despolimerizada se puede exponer a múltiples lavados en alcohol ácido caliente (p. ej., a temperaturas que varían entre 30 a 80°C) para eliminar cualquier endotoxina residual, cobre, metales pesados, contaminantes agrícolas y otras impurezas.

En algunas realizaciones, el compuesto no induce una viabilidad disminuida cuando se usa para tratar células estrelladas hepáticas humanas inmortalizadas LX2.

- 50 En algunas realizaciones, el compuesto es capaz de reducir la expresión de galectina-3 en la superficie celular o una disminución sustancial en la secreción de galectina-3 en el medio cuando se usa para tratar células estrelladas hepáticas humanas inmortalizadas LX2 estresadas que producen galectina-3.

- Los aspectos de la invención se refieren a un compuesto de arabinogalacto-ramnogalacturonano que comprende un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (GalA) ligados 1,4 y de metil galacturonato (MeGalA) ligados a heteropolímeros ramificados de oligómeros alternantes de residuos de  $\alpha$ -ramnosa ligados 1,2 y  $\alpha$ -GalA ligados 1,4, los residuos de ramnosa que llevan una ramificación primaria de oligómeros de residuos de 1,4- $\beta$ -D-galactosa, residuos de 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa, o combinaciones de los mismos, en donde el compuesto es capaz de reducir la secreción de la citoquina TNF alfa a partir de monocitos estresados con endotoxina, en donde el compuesto no inhibe la proliferación de células cancerosas en una apoptosis de células cancerosas o un modelo citotóxico, y en donde el compuesto no es citotóxico para monocitos o monocitos activados.
- En algunas realizaciones, el compuesto no inhibe la proliferación de células cancerosas en una célula cancerosa y no es citotóxico para monocitos o monocitos activados a concentraciones de hasta 500  $\mu$ g/ml.
- En algunas realizaciones, el esqueleto de residuos de ácido galacturónico ligados 1,4 y de metil galacturonato puede representar entre el 55 y 85 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, el heteropolímero ramificado de residuos alternantes de ramnosa ligada  $\alpha$ -1,2 y GalA ligada  $\alpha$ -1,4 pueden representar entre el 1 y el 3 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, el oligómero de 1,4- $\beta$ -D-galactosa de la ramificación primaria puede representar entre el 6 y el 15 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos y el oligómero de 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa de la ramificación primaria puede representar entre el 2 y el 8 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, según se caracteriza mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas.
- Los residuos de 1,4- $\beta$ -D-galactosa, residuos de 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa o una combinación de los mismos representan al menos el 8 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos.
- En algunas realizaciones, los residuos de 1,4- $\beta$ -D-galactosa y de 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa pueden estar presentes en una proporción 2:1.
- En algunas realizaciones, el compuesto puede tener un peso molecular promedio que varía de 5 kDa a 55 kDa o que varía de 2 kDa a 70 kDa.
- En algunas realizaciones, el compuesto puede tener un grado de metoxilación que varía de 40% a 70% hasta un máximo de 87%.
- El compuesto tiene una proporción de metil galacturonato a ácido galacturónico que varía de 2:1 a 1:2.
- En algunas realizaciones, el compuesto puede tener una proporción de metil galacturonato más ácido galacturónico a galactosa que varía de 4:1 a 8:1.
- En algunas realizaciones, el compuesto no induce una viabilidad disminuida cuando se usa para tratar células estrelladas hepáticas humanas inmortalizadas LX2.
- En algunas realizaciones, el compuesto es capaz de inducir una disminución sustancial en la expresión de galectina-3 en la superficie celular o una disminución sustancial en la secreción de galectina-3 en el medio cuando se usa para tratar células estrelladas hepáticas humanas inmortalizadas LX2 estresadas que producen galectina-3.
- Los aspectos de la invención se refieren a composiciones que comprenden un compuesto en un vehículo farmacéutico aceptable para usar en formulaciones terapéuticas. En algunas realizaciones, la composición se puede administrar parenteralmente a través de ruta intravenosa, subcutánea, u oral.
- En algunas realizaciones, la composición puede comprender además un agente terapéutico. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un compuesto antioxidante, un agente antiinflamatorio, vitaminas, un suplemento nutraceutico o combinaciones de los mismos.
- En algunas realizaciones, la composición se puede usar en el tratamiento de esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis, trastornos inflamatorios y autoinmunes, afecciones neoplásicas o de cáncer.
- En algunas realizaciones, la composición se puede usar en el tratamiento de fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, o fibrosis cardiaca.
- En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición o un compuesto utilizado en el tratamiento de trastornos inflamatorios y fibróticos en los que las galectinas están, al menos en parte, involucradas en la patogénesis, que incluye, pero no se limita a, aumento de la actividad anti-fibrosis en órganos, que incluyen, pero no se limitan a, hígado, riñón, pulmón, y corazón.
- En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición o un compuesto que tiene actividad terapéutica para reducir la patología y la actividad de la enfermedad asociada con la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que incluye, pero no se limita a, esteatosis (acumulación de grasa en los hepatocitos), degeneración en globo de los hepatocitos, infiltrado inflamatorio en el hígado, y deposición de colágeno o fibrosis.

- En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición o un compuesto utilizado en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes en los que las galectinas están, al menos en parte, involucradas en la patogenicidad, que incluye, pero no se limita a, artritis, artritis reumatoide, asma, y enfermedad inflamatoria intestinal.
- 5 En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición o un compuesto utilizado en el tratamiento de afecciones neoplásicas (p. ej., cánceres) en los que las galectinas están, al menos en parte, involucradas en la patogénesis inhibiendo procesos promovidos por el aumento de galectinas, que incluyen, pero no se limitan a, invasión de células tumorales, metástasis y neovascularización.
- 10 En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición o un compuesto utilizado para mejorar la capacidad de las células T infiltrantes tumorales, que se inhiben al menos en parte por el efecto de proteínas de galectina derivadas de tumores, para que identifique y mate más eficazmente las células tumorales y, por lo tanto, disminuya, detenga o invierta la progresión de los tumores.
- En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto despolimerizado o de la composición puede ser compatible y eficaz en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de varios fármacos antiinflamatorios, vitaminas, otros productos farmacéuticos y neutraceuticos, sin limitación.
- 15 En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto despolimerizado o de la composición puede ser compatible y eficaz en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de varios compuestos antioxidantes como glicirricina, ácido ascórbico, L-glutation, cisteamina y similares o combinaciones de estos.
- 20 En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o de la composición puede ser no tóxica y no inducir apoptosis en líneas celulares cultivadas cuando se añade a medios de cultivo celular, que incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares LX-2, u otras células estrelladas.
- En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o de la composición no es citotóxica para células cultivadas de mamífero cuando se añade a medios de cultivo celular que incluyen, pero no se limitan a, células de melanoma B16-F10, células monocito/macrófago THP-1, células mononucleares primarias de sangre periférica (PBMC) y células fibroblásticas de pulmón MRC-5.
- 25 En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o de la composición puede tener un efecto antiinflamatorio en líneas celulares según se mide mediante la producción de citoquinas proinflamatorias que incluyen, pero no se limitan a, TNF-alfa.
- 30 En algunas realizaciones, se puede determinar la eficacia del compuesto o de la composición para el tratamiento de la fibrosis hepática administrando el compuesto o composición a modelos animales de fibrosis que incluyen, pero no se limitan a, ratas inyectadas intraperitonealmente con la toxina química tioacetamida, lo que da como resultado al menos una reducción del 5% al 25% en el contenido de colágeno en el hígado, según lo determinado mediante cuantificación morfométrica.
- 35 En otra realización, se puede determinar la eficacia de la composición para el tratamiento de NASH administrando el compuesto o composición a modelos animales de NASH que incluyen, pero no se limitan a, ratones a los que se ha convertido en diabéticos y se les ha dado una dieta rica en grasas, lo que da como resultado una reducción de al menos el 5% en la acumulación de grasa hepatocelular, al menos una reducción del 5% en el número de hepatocitos con degeneración en globo, al menos una reducción del 5% en la infiltración hepática de células inflamatorias, y al menos una reducción del 5% en el contenido de colágeno hepático determinada mediante cuantificación morfométrica (evaluada mediante tinción positiva para rojo Sirio).
- 40 En otra realización, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto despolimerizado o de la composición a un modelo animal de NASH puede dar como resultado una reducción de la fibrosis según lo medido por histopatología estándar de biopsias, reducción en la actividad de la enfermedad mediante clasificación NAFLD, una disminución en el número de células que expresan Actina de Músculo Liso alfa, o una disminución en otros mediadores inflamatorios o una disminución en el tráfico de lípidos y en las enzimas del metabolismo que incluyen, pero no se limitan a, CD36.
- 45 En otra realización, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto despolimerizado o de la composición puede dar como resultado la reducción de galectina-3 según lo medido por el nivel de ARNm o la expresión de la proteína que une galactosa.
- 50 En otra realización, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto despolimerizado o de la composición puede dar como resultado el crecimiento, invasión, metástasis reducidos, o sensibilidad aumentada al sistema inmune innato de tumores singénicos o xenotópicos en animales.
- Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada.

**Breve descripción de las figuras**

- 5 La presente invención se explicará adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos, en donde se hace referencia a estructuras similares con números similares a lo largo de diversas vistas. Los dibujos que se muestran no están necesariamente a escala, sino que se hace énfasis, en general, en ilustrar los principios de la presente invención.
- La FIG. 1 muestra un esquema de un diagrama de flujo del proceso de fabricación que puede utilizarse en una realización para fabricar el Compuesto G, el ingrediente farmacéutico activo.
- La FIG. 2 muestra una ilustración de la estructura molecular del Compuesto G de acuerdo con algunas realizaciones.
- 10 La FIG. 3a muestra un gráfico de Zimm de cálculo del peso molecular promedio calculado para el compuesto selectivamente despolimerizado de la presente invención (Compuesto G) según lo determinado por el método de Dispersión de Luz Multi-ángulo (MALS). La FIG. 3b muestra un gráfico de Zimm de cálculo de parámetros dn/dc calculados para el compuesto selectivamente despolimerizado (Compuesto G) de la presente invención en una solución tamponada de EDTA 10 nM según lo determinado por el método de Dispersión de Luz Multi-ángulo (MALS).
- 15 La FIG. 4a muestra la determinación de la distribución del peso molecular del compuesto selectivamente despolimerizado (Compuesto G) de la presente invención usando un método de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). La curva estándar establecida mediante referencia con los estándares de peso molecular (PM) de polisacáridos monitorizados mediante detector de Índice de Refracción (IR) que se usan para calcular el peso molecular promedio. La FIG. 4b muestra el perfil del compuesto selectivamente despolimerizado (Compuesto G) de la presente invención según se caracteriza mediante el detector de Índice de Refracción (IR).
- 20 La FIG. 5a muestra la RMN bidimensional (RMN de 2-D) del espectro combinado de RMN D1 y C13 para el Compuesto G. Esta RMN bidimensional representa una identificación mediante huella dactilar de los enlaces glicosídicos del Compuesto G. La FIG. 5b muestra la RMN bidimensional (RMN de 2-D) del espectro combinado de RMN D1 y C13 para el Compuesto S. La Figura 5c muestra una comparación por superposición de estos espectros que demuestra las diferencias entre el Compuesto G y el Compuesto S. Las señales en círculo son específicas del Compuesto G.
- 25 La FIG. 6a-d es una representación de varios tipos de experimentos que demuestran la ausencia de citotoxicidad y apoptosis del Compuesto G en la línea de células estrelladas de hígado LX-2 cultivadas. La FIG. 6a es un gráfico que muestra la incorporación de timidina marcada radiactivamente en células LX-2 cultivadas. La FIG. 6b es un gráfico que muestra la evaluación de la viabilidad celular en células LX-2 cultivadas. La FIG. 6c representa una evaluación de la apoptosis y del ciclo celular mediante FACS en células LX-2 cultivadas. La FIG. 6d muestra una evaluación de la apoptosis mediante fragmentación de ADN en células LX-2 cultivadas usando el kit APC de detección de apoptosis de Anexina V (eBioscience).
- 30 La FIG. 7 es un gráfico que muestra la citotoxicidad relativa en la línea celular de monocito/macrófago THP-1 después de 3 días en presencia del Compuesto G de la presente invención (cuadrado), Compuesto D, un producto de galactomanano (diamante) y digitoxina (triángulo).
- La FIG. 8 es un gráfico que muestra la citotoxicidad relativa en la línea celular de melanoma B16-F10 cultivada después de 3 días en presencia del Compuesto G de la presente invención (diamante), el Compuesto D, un producto de galactomanano (cuadrado) y 5-Fluorouracilo (triángulo).
- 40 La FIG. 9 es un gráfico que muestra la ausencia de citotoxicidad del Compuesto G en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) cultivadas, un cultivo de células primarias.
- La FIG. 10 es un gráfico que muestra la ausencia de citotoxicidad en el crecimiento de células de fibroblastos de pulmón (MRC-5\*) después de 4 días de crecimiento en presencia de los Compuestos G y Compuesto D. La citotoxicidad se midió usando el ensayo MTS.
- 45 La FIG. 11 es un gráfico que muestra el efecto antiinflamatorio relativo de tres polisacáridos modificados que incluye el Compuesto G de la presente invención, sobre la secreción de TNF-alfa por células PBMC estresadas con endotoxina microbiana (50 ng/ml).
- La FIG. 12 es una comparación del Compuesto G de la presente invención y el Compuesto H sobre la secreción de TNF-alfa por células PBMC estresadas con endotoxina microbiana (50 ng/ml).
- 50 La FIG. 13 es una fotografía de la tinción inmunológica de galectina-3 con Mab-HRP que representa el efecto supresor de anti-galectina del Compuesto G sobre la secreción de galectina-3 por células LX-2.
- La FIG. 14 es una representación de un modelo experimental de fibrosis de rata inducido por inyección de tioacetamida (modelo TAA, un modelo de fibrosis hepática por toxicidad química).

La FIG. 15 es una representación fotográfica de la regresión histológica de la fibrosis (tinción de rojo Sirio para el colágeno) después de 4 tratamientos semanales con Compuesto G de fibrosis hepática inducida por TAA.

5 La FIG. 16 es una comparación gráfica y estadística del porcentaje de colágeno en el hígado (como medida de la fibrosis) en un modelo TAA después de 4 tratamientos semanales con vehículo control, Compuesto D y Compuesto G. Se usó la tinción de rojo Sirio para la medición cuantitativa del porcentaje de colágeno en los cortes histológicos.

La FIG. 17 es una representación del modelo de fibrosis de hígado graso de ratón, un modelo experimental de NASH asociado con trastorno metabólico (diabetes grave) y dieta alta en grasas. También se muestra el diseño experimental del tratamiento con el Compuesto G y el Compuesto D.

10 La FIG. 18 es un gráfico que muestra el cambio en el peso corporal de ratones NASH tratados con vehículo, Compuesto D o Compuesto G.

Las FIGS. 19 A-B muestran la significación estadística de la extensión de la descripción de la extensión de la esteatosis de células hepáticas, la degeneración en globo, y la inflamación lobular (como se resume en un recuento de actividad NAFLD) en ratones tratados con vehículo, Compuesto D, y Compuesto G.

15 Las FIGS. 20 A-B muestran la significancia estadística de la extensión del porcentaje de colágeno en secciones de hígado según lo medido mediante el método de tinción del rojo Sirio, para ratones NASH tratados con vehículo, Compuesto D, y Compuesto G.

### Descripción detallada de la invención

20 Las realizaciones detalladas de la presente invención se describen en esta memoria; sin embargo, debe entenderse que las realizaciones descritas son meramente ilustrativas de la invención que se pueden realizar de diversas formas. Además, cada uno de los ejemplos proporcionados en relación con las diversas realizaciones de la invención pretende ser ilustrativo y no restrictivo. Además, las cifras no están necesariamente a escala, algunas características pueden ser exageradas para mostrar detalles de componentes particulares. Además, cualquier medida, especificaciones y similares que se muestran en las figuras se pretende que sean ilustrativas y no restrictivas. Por lo tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos descritos en esta memoria no deben interpretarse como limitantes, sino simplemente como una base representativa para enseñar a un experto en la técnica a emplear de manera diversa la presente invención.

25 La cita de documentos en esta memoria no pretende ser una admisión de que cualquiera de los documentos en esta memoria es pertinente de la técnica anterior, o una admisión de que los documentos citados se consideran material para la patentabilidad de las reivindicaciones de la presente solicitud.

30 A menos que se especifique lo contrario, todos los porcentajes expresados en esta memoria son peso/peso.

35 Las pectinas están compuestas por polímeros de carbohidratos grandes y diversificados que están compuestos por un esqueleto de ácido galacturónico polimérico con moléculas de ramnosa intercaladas periódicas y cadenas ramificadas periódicas de diversos carbohidratos que incluyen galactosa, arabinosa, fucosa, glucosa, y otros. Las moléculas de ácido galacturónico se modifican naturalmente mediante metoxilación en un alto porcentaje de los residuos.

40 Los grandes polímeros de carbohidratos de pectina se han estudiado en su forma nativa (directamente después de la extracción de plantas) y después de varios grados de modificación que hidrolizan y modifican químicamente los polímeros. Mientras las pectinas modificadas se usan ampliamente en la industria alimentaria por su capacidad de gelificar y dar consistencia a diversas preparaciones alimenticias, también se han evaluado como posibles compuestos medicinales.

45 Los materiales de pectina derivados de plantas, tanto modificados como inalterados, se han evaluado ampliamente cuando se administran por vía oral a animales y seres humanos. Se han descrito una variedad de efectos de las pectinas modificadas e inalteradas administradas por vía oral que incluyen saciedad aumentada, pérdida de peso, modificación de la motilidad intestinal y efectos sobre la función intestinal que incluyen efectos beneficiosos sobre el estreñimiento y la diarrea. El material de pectina ingerido no es digerido por las enzimas intestinales normales ni es absorbido por el intestino. Por lo tanto, hay poca o ninguna pectina que se absorba en el torrente sanguíneo después de la absorción oral.

50 Con el fin de evaluar el efecto de las pectinas y moléculas de pectina modificadas en la circulación sistémica y órganos de animales y seres humanos, se han hecho intentos para desarrollar pectinas modificadas que podrían utilizarse como compuestos parenterales. Se ha evaluado la pectina derivada de una mezcla de frutos cítricos en modelos de cultivos celulares y en modelos animales de enfermedades, en particular en células cancerosas y modelos de cáncer en animales. Se ha demostrado que el uso de pectina cítrica modificada causa toxicidad y apoptosis en líneas celulares de animales. Se ha propuesto que dicha pectina cítrica modificada es útil en afecciones malignas (véase el documento US 8.128.966).

## Galectinas

Las galectinas (también conocidas como galaptinas o S-lectina) son una familia de lectinas que se unen a beta-galactósido. La galectina como nombre general se propuso en 1994 para una familia de lectinas animales (Barondes, S.H., et al.: *Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins*. *Cell* 76, 597-598, 1994). La familia se define por tener al menos un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) característico con una afinidad por los beta-galactósidos y compartir ciertos elementos de secuencia. Dentro de la misma cadena peptídica, algunas galectinas tienen un CRD con solo unos pocos aminoácidos adicionales, mientras que otras tienen dos CRDs unidos por un péptido de unión, y una (galectina-3) tiene un CRD unido a un tipo diferente de dominio. El dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de galectina es un sándwich beta de aproximadamente 135 aminoácidos. Las dos láminas están ligeramente dobladas con 6 cadenas que forman el lado cóncavo y 5 cadenas que forman el lado convexo. El lado cóncavo forma un surco en el que se une el carbohidrato (Leffer H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F (2004). "Introducing to galectins". *Glycoconj. J.* 19 (7-9): 433-40).

Se ha demostrado que una amplia variedad de fenómenos biológicos están relacionados con las galectinas, p. ej., desarrollo, diferenciación, morfogénesis, metástasis tumoral, apoptosis, corte y empalme de ARN, etc. Sin embargo, se sabe relativamente poco sobre el mecanismo mediante el cual las galectinas ejercen estas funciones, particularmente en términos de reconocimiento de carbohidratos.

En general, el dominio de carbohidrato se une a residuos de galactosa asociados con glicoproteínas. Se han identificado al menos quince proteínas de galectina que tienen uno o dos dominios de carbohidratos en tándem.

Las proteínas de galectina se encuentran en el espacio intracelular donde se les ha asignado una serie de funciones y se secretan en el espacio extracelular. En el espacio extracelular, las proteínas de galectina pueden tener múltiples funciones que incluyen la promoción de interacciones entre glicoproteínas que pueden dar lugar a una función reducida, o funciones aumentadas, o en el caso de receptores de glicoproteínas de membrana integrales, la modificación de la señalización celular (Sato et al "Galectins as danger signals in host-pathogen and host-tumor interactions: new members of the growing group of "Alarmins". En "Galectins", (Klyosov, et al eds.), John Wiley and Sons, 115-145, 2008, Liu et al "Galectins in acute and chronic inflammation", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253: 80-91, 2012). Las proteínas de galectina en el espacio extracelular pueden promover adicionalmente las interacciones célula-célula y matriz celular (Wang et al., "Nuclear and cytoplasmic localization of galectin-1 and galectin-3 and their roles in pre-mRNA splicing". En "Galectins" (Klyosov, et al eds.), John Wiley and Sons, 87-95, 2008).

Se ha demostrado que las galectinas tienen dominios que promueven la homodimerización. Por lo tanto, las galectinas son capaces de actuar como un "pegamento molecular" de clases entre glicoproteínas. Las galectinas se encuentran en múltiples compartimentos celulares, que incluyen el núcleo y el citoplasma, y se secretan al espacio extracelular donde interactúan con glicoproteínas de la superficie celular y de la matriz extracelular. El mecanismo de las interacciones moleculares puede depender de la localización. Mientras las galectinas pueden interactuar con glicoproteínas en el espacio extracelular, las interacciones de la galectina con otras proteínas en el espacio intracelular generalmente ocurren a través de dominios de proteína. En el espacio extracelular, la asociación de receptores de superficie celular puede aumentar o disminuir la señalización del receptor o la capacidad de interactuar con ligandos. Las proteínas de galectina están notablemente aumentadas en varios estados de enfermedad animal o humana, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades asociadas con inflamación, fibrosis, autoinmunidad, y neoplasia. Las galectinas se han implicado directamente en la patogenia de la enfermedad, como se describe a continuación. Por ejemplo, los estados de enfermedad que pueden depender de galectinas incluyen, pero no se limitan a, inflamación aguda y crónica, trastornos alérgicos, asma, dermatitis, enfermedad autoinmune, artritis inflamatoria y degenerativa, enfermedad neurológica mediada por el sistema inmune, fibrosis de múltiples órganos (que incluyen, pero no se limitan a, hígado, pulmón, riñón, páncreas, y corazón), enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis, insuficiencia cardíaca, enfermedad inflamatoria ocular, una gran variedad de cánceres.

Además de los estados patológicos, las galectinas son moléculas reguladoras importantes para modular la respuesta de las células inmunes a la vacunación, patógenos exógenos y células cancerosas.

Un experto en la técnica apreciará que los compuestos que se pueden unir a las galectinas y/o alterar la afinidad de las galectinas por las glicoproteínas, reducir las interacciones hetero- u homo-típicas entre las galectinas, o alterar de otro modo la función, síntesis, o metabolismo de las proteínas de galectina pueden tener importantes efectos terapéuticos en las enfermedades dependientes de galectinas.

Las galectinas muestran una afinidad por los residuos de galactosa unidos a otros compuestos orgánicos, como en la lactosa [(β-D-Galactosido)-D-glucosa], N-acetil-lactosamina, poli-N-acetillactosamina, galactomananos, fragmentos de pectinas, así como otros compuestos que contienen galactosa. Se debería señalar que la galactosa por sí misma no se une a las galectinas, o se une tan débilmente que la unión difícilmente se puede detectar.

Se ha demostrado que la pectina y la pectina modificada se unen a las proteínas de galectina presumiblemente sobre la base de que contienen residuos de galactosa que se presentan en el contexto de una macromolécula, en este caso un carbohidrato complejo en lugar de una glicoproteína en el caso de células animales.

Se ha demostrado que las proteínas de galectina están notablemente aumentadas en inflamación, trastornos fibróticos, y neoplasia (Ito et al. "Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment", *Cancer Metastasis Rev.* PMID: 22706847 (2012), Nangia-Makker et al. Galectin-3 binding and metastasis," *Methods Mol Biol.* 878: 251-266, 2012, Canesin et al. Galectin-3 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome," *Tomour Biol.* 31: 277-285, 2010, Wanninger et al. "Systemic and hepatic vein galectin-3 are increased in patients with alcoholic liver cirrhosis and negatively correlate with liver function," *Cytokine.* 55: 435-40, 2011. Además, los experimentos han demostrado que las galectinas, particularmente la galectina-1 y la galectina-3 están directamente implicadas en la patogénesis de estas clases de enfermedades (Toussaint et al., "Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasión.", *Mol Cancer.* 11: 32, 2012, Liu et al 2012, Newlaczyl et al., "Galectin-3-a jack-of-all-trades in cancer," *Cancer Lett.* 313: 123-128, 2011, Banh et al., "Tumor galectin-1 mediates tumor growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis," *Cancer Res.* 71: 4423-31, 2011, Lefranc et al., "Galectin-1 mediated biochemical controls of melanoma and glioma aggressive behavior," *World J. Biol. Chem.* 2: 193-201, 2011, Forsman et al., "Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis," *Arthritis Rheum.* 63: 445-454, 2011, de Boer et al., "Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure," *Curr. Heart Fail. Rep.* 7, 1-8, 2010, Ueland et al., "Galectin-3 in heart failure: high levels are associated with all cause mortality," *Int. J. Cardiol.* 150: 361-364, 2011, Ohshima et al., "Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis," *Arthritis Rheum.* 48: 2788-2795, 2003).

Por lo tanto, existe la necesidad de identificar agentes terapéuticos que afecten a las galectinas implicadas en trastornos humanos, como enfermedades inflamatorias, enfermedades fibróticas, enfermedades neoplásicas o combinaciones de estas, y que tengan un perfil de seguridad fiable, para ser usado en la terapéutica.

#### Pectinas químicamente modificadas y composiciones

Se han descrito previamente composiciones que comprenden una pectina químicamente modificada derivada de pectina de manzana y métodos para fabricar dicha pectina de manzana modificada que tiene una actividad en un ensayo celular de fibrosis inflamatoria [véase el documento US 8.236.780]. Se ha demostrado que dicha pectina modificada reduce la inducción de células fibrogénicas derivadas del hígado sin tener ningún efecto sobre la viabilidad de las células.

Los aspectos de la invención se refieren a una pectina químicamente modificada o una composición de pectina modificada. Se describen en esta memoria métodos para producir una pectina modificada o composición de pectina modificada que tiene efectos antiinflamatorios y/o antifibrogénicos. En algunas realizaciones, la pectina modificada es un polisacárido químicamente definido como galactoarabino-ramnogalacturonato.

Se describen en esta memoria composiciones para administración parenteral o enteral a un sujeto. En algunas realizaciones, la composición puede comprender un compuesto de pectina modificada de la invención en un vehículo farmacéutico aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o adyuvante que se puede administrar a un sujeto (p. ej., un paciente), junto con un compuesto de esta invención, y que no destruye la actividad farmacológica del mismo y no es tóxico cuando se administra en dosis suficiente para distribuir una cantidad terapéutica o una cantidad eficaz del compuesto.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, p. ej., albúmina humana o polipéptidos de gelatina entrecruzada, recubrimientos, compuestos antibacterianos y antifúngicos, isotónicos, p. ej., cloruro sódico o glutamato sódico, y compuestos de absorción retardada, y similares, que son fisiológicamente compatibles. El uso de tales medios y compuestos para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidural (p. ej., mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo se puede recubrir con un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

En algunas realizaciones, el compuesto de pectina modificada se obtiene a partir de una pectina de grado farmacéutico.

En algunas realizaciones, la pectina modificada de la presente invención puede tener unos efectos antiinflamatorios aumentados y/o efectos antifibrogénicos aumentados cuando se compara con composiciones de pectinas anteriores. En varias realizaciones, la pectina modificada de la presente invención puede inhibir la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ , caquexina), una proteína implicada en la inflamación sistémica y un miembro principal de un grupo de citoquinas que estimulan la reacción de fase aguda. Se produce principalmente por macrófagos activados. En varias realizaciones, la pectina modificada de la presente invención no causa citotoxicidad. En varias realizaciones, la pectina modificada o la composición de pectina modificada tiene potentes propiedades antiinflamatorias y antifibróticas sin exhibir citotoxicidad. Esto representa una nueva e inesperada combinación de efectos que sugieren que la pectina de grado farmacéutico puede tener importantes efectos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades fibróticas, enfermedades neoplásicas humanas y combinaciones de estas.

En un aspecto, se destacan métodos para tratar (p. ej., controlar, mitigar, mejorar, aliviar o disminuir la progresión de) o métodos para prevenir (p. ej., retrasar la aparición o reducir el riesgo de desarrollar) una o más enfermedades, trastornos, o afecciones en las que están implicadas las galectinas, en un sujeto que lo necesita. Los métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la invención, o una composición que comprende el compuesto de la invención, al sujeto.

Como se usa en esta memoria, el término "dosis eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto que, solo o en combinación con una cantidad de un agente terapéutico, cuando se administra como una formulación parenteral, subcutánea, inhalada, intra-articular, ocular, u oral o a un animal o ser humano con una enfermedad dependiente de galectina, enfermedad fibrótica o neoplásica da como resultado la reducción de la actividad de la enfermedad, como se define a continuación en varias realizaciones.

La "administración" se refiere a inyección e infusión oral, o parenteral que incluye intravenosa, subcutánea, tópica, transdérmica, intradérmica, transmucosal, intraperitoneal, intramuscular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidiana, intraespinal, epidural e intraesternal.

En algunas realizaciones, el compuesto de galactoarabino-ramnogalacturonato tiene residuos de galactosa terminales que pueden constituir la principal entidad de unión a las proteínas de galectina. La composición de la cadena lateral restante puede estabilizar o mejorar su interacción con las proteínas de galectina y potenciar así la acción terapéutica del compuesto. La interacción con galectinas puede no ser el único mecanismo por el cual el Compuesto G ejerce su acción terapéutica. Si bien no se desea que esté ligado a la especulación, el compuesto de galactoarabino-ramnogalacturonano ramificado de la invención puede interactuar con proteínas de galectina y puede tener amplios efectos que no se han visto con galactosa o moléculas pequeñas derivadas de galactosa.

En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención es un polisacárido químicamente definido como galactoarabino-ramnogalacturonato (también denominado en esta memoria como "Compuesto G"), un heteropolímero ramificado que tiene un esqueleto caracterizado como una mayoría de moléculas de homopolímero ácido galacturónico (GalA) ligadas 1,4 y residuos de metil galacturonato (MeGalA) con regiones cortas intermitentes de  $\alpha$ -GalA ligado 1,4 y  $\alpha$ -ramnosa (Rha) ligada 1,2 alternantes, mientras que las unidades de Rha están además unidas a cadenas laterales. Estas cadenas laterales consisten predominantemente en residuos de 1,4- $\beta$ -D-galactosa (Gal) y/o residuos de 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa (Ara). Pueden estar presentes otros carbohidratos en pequeñas cantidades en las cadenas laterales de Gal y Ara como residuos de L-xilosa (Xyl), D-glucosa (Glu) y L-fucosa (Fuc). Como se usa en esta memoria, el término "esqueleto" se refiere a la cadena principal de un polisacárido, o la cadena que se origina a partir de la cadena principal de un polisacárido de partida, que tiene restos sacáridos secuencialmente unidos mediante enlaces alfa o beta glicosídicos. Un esqueleto puede comprender restos monosacáridos adicionales conectados al mismo en varias posiciones a lo largo de la cadena secuencial.

En algunas realizaciones, el Compuesto G es un heteropolímero ramificado natural modificado químicamente controlado de polisacáridos de plantas, algunos de los cuales están disponibles comercialmente como material de pectina USP. Estos materiales de pectina natural tienen un peso molecular promedio alto que varía de 40.000 a más de 1.000.000 Daltons (D) y son mezclas crudas. Las pectinas USP más comunes son de frutos cítricos, manzana y remolachas, aunque también hay otras disponibles.

En algunas realizaciones, la composición de Compuesto G puede tener un intervalo de peso molecular promedio de 2.000 a 80.000 D. En algunas realizaciones, el peso molecular promedio del compuesto G puede variar de 20.000 a 70.000 D. En ejemplos específicos, el galactoarabino-ramnogalacturonato puede tener un peso molecular promedio de 5.000 a 55.000 D. Tales compuestos de galactoarabino-ramnogalacturonato se pueden obtener preferiblemente a través de tratamientos químicos y físicos y purificación de la sustancia péctica natural de pectina de manzana. Sin embargo, se pueden obtener compuestos similares al Compuesto G a partir de cítricos, pectina de remolacha azucarera u otras plantas bajo extracción y procesamiento químico apropiados.

En una realización, el galactoarabino-ramnogalacturonato selectivamente despolimerizado (Compuesto G), un heteropolímero ramificado, puede tener un peso molecular promedio de 2.000 a 80.000, o de 20.000 a 70.000, o de 5.000 a 55.000 Daltons, según lo determinado mediante SEC-RI y método MALLS. Como se usa en esta memoria, el término "despolimerización" se refiere a la hidrólisis parcial, selectiva o completa del esqueleto de polisacárido que se produce, por ejemplo, cuando el polisacárido se trata químicamente lo que da como resultado fragmentos de reducido tamaño cuando se comparan con el polisacárido original.

#### Métodos para producir el Compuesto G

Los aspectos de la invención se refieren a métodos para producir galactoarabino-ramnogalacturonato selectivamente despolimerizado. En algunas realizaciones, el proceso de la presente invención incluye métodos destinados a preservar la estructura y/o las características de beta galactosa y las capacidades de unión a galactosa de las cadenas laterales que comprenden principalmente galactosa y arabinosa, y a aumentar la prevalencia de restos de unión a galactosa en el compuesto de galactoarabino-ramnogalacturonato. En algunas realizaciones, los métodos pueden generar un compuesto de galactoarabino-ramnogalacturonato que tiene un peso molecular

promedio reducido, de modo que sea compatible con formulaciones terapéuticas para administración pluralista a través de rutas, que incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, subcutánea, inhalada, intraarticular, y oral.

5 En algunas realizaciones, el compuesto se puede sintetizar a partir de pectina USP natural, altamente ramificada, mínimamente procesada y altamente metoxilada que puede provenir de cualquier fuente vegetal, que incluye, pero no se limita a, frutos cítricos, manzana, o remolacha.

En algunas realizaciones, el compuesto se puede sintetizar de pectina USP natural, altamente ramificada, mínimamente procesada y altamente metoxilada, como una fabricada a partir de pulpa de manzana que contiene 8-12% de pectina.

10 En algunas realizaciones, el compuesto se puede sintetizar bajo una hidrólisis suficientemente controlada y específica de  $\alpha$ -GalA ligada 1,4 metoxilada unida con enlaces glicosídicos, mientras que conserva las cadenas laterales con cantidades enriquecidas de 1,4- $\beta$ -D-Gal y 1,5- $\alpha$ -L-Ara. Se pueden determinar cuantitativamente las cantidades de 1,4- $\beta$ -D-Gal y 1,5- $\alpha$ -L-Ara mediante métodos de GC-MS (cromatografía de gases-espectroscopía de masas) y AELC-PAD (cromatografía líquida de intercambio aniónico-detector de amperometría pulsada).

15 En algunas realizaciones, el compuesto puede producirse mediante un proceso que comprende despolimerización catabolizada mediante escisión dirigida por peroxidación de enlaces glicosídicos (también conocida como reacción de eliminación beta) por OH ionizado supergenerado a partir de ácido ascórbico y/o peróxido en presencia de una forma reducida de un ion de metal de transición, como Cu sup.++ de 1 a 100 mM. También se pueden usar para este propósito otros metales de transición como Ca. sup.++ o Fe. sup.++.

20 En algunas realizaciones, el compuesto despolimerizado se puede exponer a un intervalo de pH de 8 a 10 durante 10 a 30 minutos a temperatura de 2 a 60°C para iniciar la desmetoxilación parcial controlada para generar un compuesto selectivamente despolimerizado medio con un grado de metoxilación de 40 a 70 por ciento en comparación con los niveles iniciales de aproximadamente 87%. El compuesto resultante se puede referir como compuesto metoxilado medio. La metoxilación completa del ácido galacturónico se considera que es de aproximadamente DE 87%.

25 En algunas realizaciones, el polisacárido selectivamente despolimerizado de la presente invención puede tener un nivel de endotoxina de no más de 100 EU o no más de 300 EU según lo evaluado mediante el método LAL.

En algunas realizaciones, el polisacárido selectivamente despolimerizado de la presente invención puede tener no más de 0,05% de impurezas nitrogenadas, según lo evaluado mediante nitrógeno total.

30 En algunas realizaciones, el polisacárido selectivamente despolimerizado se puede exponer a múltiples lavados de alcohol ácido caliente (30-80°C) para eliminar cualquier endotoxina, cobre, metales pesados, contaminantes agrícolas y otras impurezas residuales.

#### Usos

35 En algunas realizaciones, la actividad terapéutica del compuesto de la invención se puede derivar de múltiples restos de beta-galactosa y arabinosa múltiples presentes en el compuesto. Tales restos pueden imitar a glicoproteínas celulares de las superficies celulares y de la matriz extracelular que se unen a proteínas de galectina (p. ej., proteínas que unen galactosa) que se expresan altamente en procesos inflamatorios, fibrogénicos, y tumorigénicos. La expresión de galectina-3 ha demostrado ser crítica para la inflamación y la fibrogénesis en múltiples órganos, que incluyen, pero no se limitan a, hígado, riñón, corazón, y pulmón. La modulación de su actividad puede llevar a la inhibición y la reversión de los procesos patológicos.

40 En otra realización, el polisacárido selectivamente despolimerizado de la presente invención no tiene citotoxicidad y no induce apoptosis en sistemas de cultivo celular. Como tal, el polisacárido selectivamente depolimerizado de la presente invención difiere de otras preparaciones conocidas de pectinas modificadas que se han descrito (Véase el documento US 8.128.966).

45 En otra realización, el polisacárido selectivamente despolimerizado de la presente invención puede tener un efecto antiinflamatorio sobre células mononucleares de sangre periférica (PMBC) y otras líneas celulares inflamatorias. Por ejemplo, el Compuesto G puede reducir la expresión o la respuesta a inductores de genes de citoquinas o proteínas, que incluyen, pero no se limitan a, TNF-alfa. El proceso de inflamación y reparación puede implicar múltiples tipos celulares que incluyen células del sistema inmune y muchos mediadores inflamatorios en una cascada compleja e interconexiónada de eventos. La inflamación aguda puede acabar o progresar a una fase crónica que puede dar lugar a fibrosis, una etapa tardía del daño que se observa en una variedad de enfermedades de órganos humanos, que incluyen, pero no se limitan a, hígado, pulmón, riñón, corazón y páncreas.

50 La inflamación crónica en órganos a menudo lleva a una acumulación de tejido fibrótico. De hecho, el resultado final de la inflamación de múltiples etiologías subyacentes es generalmente fibrosis y disfunción resultante del órgano. Esto es evidente en, por ejemplo, pulmón, corazón, riñón, páncreas, e hígado. Múltiples líneas de evidencia apuntan a las proteínas de galectina, y en particular galectina-3, como factores críticos en la patogénesis de la fibrosis de

55

- órganos. Se ha demostrado, por ejemplo, que ratones nulos knockout de Galectina-3 son resistentes a la fibrosis del hígado en respuesta a las hepatotoxinas, resistentes a la fibrosis pulmonar en respuesta a la bleomicina intratraqueal, y se pueden usar como modelos de fibrosis renal, fibrosis cardíaca y pancreatitis crónica (Henderson et al., "The regulation of inflammation by galectin-3," *Immunol Rev.* 230: 160-171, 2009, Iacobini et al., "Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver." *J. Hepatol.* 54: 975-983, 2011, Lopez et al., "Gene expression profiling in lungs of chronic asthmatic mice treated with galectin-3: downregulation of inflammatory and regulatory genes," *Mediators Inflamm.*, 823279. Epub 2011, Kolatsi-Joannou et al., "Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury," *PLoS One.* 6(4): e18683, 2011).
- 5
- 10 La "fibrosis" se refiere a cualquier trastorno tisular, que incluye, pero no se limita a, tales trastornos celulares como, por ejemplo, cirrosis, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis ovárica, fibrosis pulmonar, fibrosis gastrointestinal o estomacal, y fibromas. El término "fibrosis" se refiere tanto al proceso patológico que lleva de la lesión del tejido a través de su encapsulación por la matriz extracelular, y el resultado del proceso, que es una formación patológica de tejido cicatricial.
- 15 La "cirrosis" se refiere a cualquier trastorno tisular, que incluye tales trastornos celulares que incluyen, pero no se limitan a, cirrosis renal, cirrosis hepática, cirrosis ovárica, cirrosis pulmonar, cirrosis gastrointestinal o estomacal. El término "cirrosis" se refiere a una etapa avanzada de fibrosis, definida por la presencia de nódulos encapsulados. Para los fines de esta especificación y reivindicaciones, "cirrosis" se considera un tipo de fibrosis, y se incluye dentro del significado del término "fibrosis" usado en esta memoria.
- 20 Como se usa en esta memoria, "marcadores moleculares", "marcadores bioquímicos", "biomarcadores" o "marcadores" se usan indistintamente y se refieren a moléculas individuales de origen biológico, que se pueden monitorizar como una "lectura" de eventos metabólicos específicos. Estos eventos están acompañados por la formación de los "marcadores", cuyo nivel cualitativo a menudo se puede usar como una indicación del avance del evento.
- 25 La lesión que da lugar a fibrosis en el hígado puede ocurrir en respuesta a una variedad de ataques crónicos, que incluyen, pero no se limitan a, abuso de alcohol, fármacos, toxinas, depósitos de grasa, hepatitis viral B y C, algunas enfermedades metabólicas que originan irritación tisular crónica y/o permanente que provoca inflamación y deposición de colágeno, o fibrosis.
- 30 La etapa avanzada de la fibrosis hepática es la cirrosis, definida por la presencia de nódulos hepatocelulares encapsulados por amplias bandas de tejido fibroso. La fibrosis es una respuesta sistemática y coordinada a una lesión crónica, que se desarrolla a través de una serie de eventos moleculares altamente coordinados, llamados colectivamente fibrogénesis. Por ejemplo, la fibrosis se puede desarrollar como resultado de una lesión hepática crónica en mamíferos. Las etapas que siguen inmediatamente a la lesión hepática crónica pueden dar como resultado la activación de células estrelladas hepáticas. La activación de células estrelladas puede dar lugar a la proliferación, fibrogénesis y cirrosis. Los eventos de activación en las células estrelladas se pueden identificar mediante marcadores moleculares específicos, como colágeno I, actina de músculo liso-1 alfa, receptor beta de PDGF (un biomarcador de proliferación), metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores MMP2, MMP9, TIMP1 y TIMP2 (marcadores en la degradación de la matriz), y una variedad de citoquinas, que incluyen, pero no se limitan a, TGF-beta1 (un marcador de fibrogénesis). El desarrollo de la fibrosis puede evaluarse por el nivel cuantitativo de los marcadores respectivos. La reducción de la fibrosis se puede evaluar mediante la disminución del nivel de los marcadores respectivos durante varias etapas de la fibrosis.
- 35
- 40 El espectro fisiopatológico de la fibrosis puede estar asociado con biomarcadores séricos que incluyen, pero no se limitan a, ácido hialurónico y otros productos de degradación de colágenos, citoqueratina-18 y otras proteínas celulares del citoesqueleto, inhibidores tisulares de la metaloproteasa I y II, otros colágenos derivados del hígado, proteasas de matriz o combinaciones de los mismos. Estos compuestos y/o biomarcadores se pueden medir en suero o en tejido hepático usando inmunoensayos y los niveles correlacionados con la gravedad de la enfermedad y el tratamiento.
- 45
- El espectro fisiopatológico de la fibrosis también puede estar asociado con biomarcadores séricos, que incluyen, pero no se limitan a, productos reactivos de oxígeno de origen lipídico o proteico, moléculas o conjugados lipídicos, o combinaciones de los mismos. Estos biomarcadores se pueden medir por diversos medios, que incluyen inmunoensayos y electroforesis y sus niveles correlacionados con la gravedad de la enfermedad y el tratamiento. Los biomarcadores adicionales pueden incluir cambios globales en el análisis proteómico de proteínas del suero o de la orina.
- 50
- El espectro fisiopatológico de la fibrosis también puede estar asociado con biomarcadores séricos de NASH, un trastorno inflamatorio metabólico crónico que da lugar a fibrosis y se describe en esta solicitud. Estos biomarcadores pueden ser citoquinas, que incluyen, pero no se limitan a, TNF-alfa, TGF-beta o IL-8, o un perfil metabólico de componentes del suero que es indicativo de la presencia o gravedad de NASH (estos incluyen marcadores de suero y orina) o combinaciones de estos. Un perfil de uno o más de los biomarcadores de citoquinas, medidos por
- 55

inmunoensayo o evaluación proteómica mediante espectrometría de masas LC, puede proporcionar una evaluación de la actividad de la enfermedad y un marcador a seguir en la terapia de la enfermedad.

5 El espectro fisiopatológico de la fibrosis en el hígado también se puede asociar con hallazgos histopatológicos en la biopsia hepática, que incluyen, pero no se limitan a, evidencia de deposición de colágeno (que incluye, pero no se limita a, depósito de colágeno peri-sinusoidal, portal, central o combinaciones de los mismos), deposición de colágeno de puente portal a central, nódulos hepatocelulares que distorsionan la arquitectura normal, atipia hepatocelular consistente con transformación maligna o combinaciones de los mismos.

10 El espectro fisiopatológico de la fibrosis en el hígado también se puede asociar con otros hallazgos histológicos patológicos en la biopsia hepática que se asocian con la causa subyacente de la enfermedad crónica del hígado que da como resultado la fibrosis. Dichos hallazgos pueden incluir, pero no se limitan a, anomalías en los hepatocitos (que incluyen, pero no se limitan a, degeneración en globo e hialina intracelular y grasa macrovesicular o microvesicular o combinaciones de las mismas), células endoteliales, macrófagos, o células del conducto biliar y la infiltración de múltiples tipos de células inflamatorias, como linfocitos, monocitos, y/o neutrófilos, o cualquier combinación de los anteriores.

15 El espectro fisiopatológico de la fibrosis también puede incluir hallazgos histopatológicos en la biopsia hepática que están relacionados con la enfermedad subyacente de NASH. Tales hallazgos pueden incluir, pero no se limitan a, evidencia de grasa intrahepatocelular, toxicidad hepatocelular que incluye, pero no se limita a, cuerpos hialinos, infiltrados de células inflamatorias (que incluyen, pero no se limitan a, linfocitos y varias subpoblaciones de linfocitos y neutrófilos), cambios en las células del conducto biliar, cambios en las células endoteliales, número de macrófagos  
20 células de Kupffer, deposición de colágeno (que incluye, pero no se limita a, deposición de colágeno peri-sinusoidal, portal y central y deposición de colágeno de puente portal a central, nódulos hepatocelulares que distorsionan la arquitectura normal, atipia hepatocelular consistente con transformación maligna, y varias escalas y métodos que combinan varios conjuntos de observaciones para calificar la gravedad de NASH o cualquier combinación de las anteriores. Estas evaluaciones histológicas pueden ser la condición sine-qua-non del diagnóstico de NASH y, por lo tanto, pueden relacionarse integralmente con la evaluación de la terapia.

25 El espectro fisiopatológico de la fibrosis también puede incluir hallazgos histopatológicos en la biopsia hepática que examinan la expresión de o el cambio en la expresión de diversas moléculas y su localización en el tejido hepático o en diversos tipos de células. Moléculas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, diversas proteínas de citoquinas. Las proteínas de citoquinas de interés pueden incluir, pero no se limitan a, TGF-beta, mediadores inflamatorios,  
30 proteínas de transporte secuestrantes de metabolitos reactivos, que incluyen, pero no se limitan a, CD36, y proteínas de galectina, que incluyen, pero no se limitan a, proteína galectina-3, o cualquier combinación de las anteriores.

35 Las manifestaciones clínicas de la fibrosis pueden incluir, pero no se limitan a, pruebas clínicas de la etapa y gravedad de la enfermedad, signos clínicos y síntomas de la enfermedad, y/o complicaciones médicas resultantes de la fibrosis. Las pruebas clínicas del estadio y la gravedad de la fibrosis hepática pueden incluir, pero no se limitan a, pruebas hematológicas (que incluyen, pero no se limitan a, recuento y/o morfología de glóbulos rojos, recuento y/o diferencial y/o morfología de células blancas, y recuento y morfología de plaquetas), lípidos en suero o plasma, que incluyen, pero no se limitan a, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos, especies de lipoproteínas y especies de peroxidación lipídica, enzimas de suero o plasma (que incluyen, pero no se limitan a, aspartato transaminasa (AST),  
40 alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (AP), gamma glutamiltranspeptidasa (GGTP), lactato deshidrogenasa (LDH), e isoformas, albúmina sérica o plasmática y otras proteínas indicativas de la capacidad sintética del hígado, niveles séricos o plasmáticos de bilirrubina u otros compuestos indicativos de la capacidad del hígado de para eliminar subproductos metabólicos, electrolitos séricos o plasmáticos (que incluyen, pero no se limitan a, sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo), perfil de coagulación que incluye, pero no se limita a, tiempo de protrombina (PT),  
45 tiempo parcial de tromboplastina (PTT), niveles de factor de coagulación específico, tiempo de sangrado y función plaquetaria. Las pruebas clínicas también incluyen, pero no se limitan a, pruebas no invasivas e invasivas que evalúan la arquitectura, integridad estructural o función del hígado que incluyen, pero no se limitan a, tomografía computarizada (TC scan), ultrasonidos (US), elastografía ultrasónica (FibroScan) u otras mediciones de la elasticidad del tejido hepático, exploración por resonancia magnética o espectroscopía, elastografía por resonancia  
50 magnética, biopsia hepática percutánea o con aguja fina o transyugular y evaluación histológica (que incluye, pero no se limita a, tinción para diferentes componentes usando colorantes de afinidad o inmunohistoquímica), medición del gradiente de presión de enclavamiento portal-venoso hepático, u otras pruebas no invasivas o invasivas que se pueden desarrollar para evaluar la gravedad de la fibrosis en el tejido hepático o cualquier combinación de las anteriores.

55 Los signos y síntomas clínicos de la fibrosis avanzada que ha progresado a cirrosis pueden incluir fatiga, pérdida de peso muscular, angiomas de araña, dolor abdominal, hinchazón abdominal, ascitis, hemorragia gastrointestinal, otras complicaciones de sangrado, facilidad de moratones y equimosis, edema periférico, hepatomegalia, hígado nodular firme, somnolencia, trastornos del sueño, confusión y/o coma. Las complicaciones médicas de la fibrosis están relacionadas con la cirrosis e incluyen ascitis, edema periférico, varices esofágicas y otras del tracto  
60 gastrointestinal, sangrado gastrointestinal, otras complicaciones de sangrado, emaciación y pérdida de masa muscular, síndrome hepatorenal, y encefalopatía hepática. Una complicación adicional de la fibrosis relacionada con

la cirrosis es el desarrollo de complicaciones suficientemente graves para justificar la colocación en la lista de trasplantes de hígado o recibir un trasplante de hígado.

5 La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la esteatohepatitis (NASH) son trastornos hepáticos comunes en los Estados Unidos y Europa. Histopatológicamente, estos trastornos se parecen a la enfermedad hepática alcohólica, aunque pueden darse en personas que beben poco o nada de alcohol. Los cambios patológicos en el hígado incluyen, pero no se limitan a, acumulación de grasa en los hepatocitos, evidencia de degeneración hepatocelular, infiltrados de células inflamatorias, deposición de tejido fibroso en exceso, formación de nódulos hepatocelulares, cirrosis, carcinoma hepatocelular y combinaciones de los mismos.

10 La característica principal en la NAFLD es la acumulación de grasa en los hepatocitos con inflamación mínima. La NAFLD generalmente se identifica sobre la base de una biopsia hepática realizada debido a niveles ligeramente elevados de transaminasas hepáticas en el suero del paciente o la sospecha de hígado graso en pruebas no invasivas como la tomografía computerizada o la ecografía.

15 Se ha encontrado que una subpoblación de individuos con NAFLD tiene NASH, que es hígado graso con la añadidura del desarrollo de infiltración de células inflamatorias (que incluyen, pero no se limitan a, neutrófilos o linfocitos) dentro del lóbulo, áreas de vena central y portal y evidencia de daño a los hepatocitos, que incluye, pero no se limita a, degeneración en globo. Este estado inflamatorio de NASH puede dar como resultado la deposición de tejido fibroso, que incluye, pero no se limita a, colágeno, que puede provocar cirrosis, formación de nódulos, y/o carcinoma hepatocelular.

20 El progreso de la enfermedad es insidioso ya que la mayoría de las personas con NASH se sienten bien y no son conscientes de que tienen un problema hepático. A pesar de la carencia de síntomas, la NASH puede ser grave y puede dar lugar a la deposición de material fibrótico en el hígado, lo que puede provocar una cicatrización y/o cirrosis grave y, en algunos casos, carcinoma hepatocelular.

25 No se conoce la causa de la lesión hepática en NASH. Se han propuesto múltiples teorías, con algunos datos experimentales para sugerir su implicación. Algunos de estos incluyen, pero no se limitan a, resistencia de los hepatocitos a la acción de la insulina, producción de citoquinas inflamatorias por parte de las células grasas y otras células inflamatorias que dañan el hígado y reclutan células inflamatorias adicionales y estrés oxidativo en hepatocitos con producción de radicales de oxígeno reactivos que dañan las células del hígado e inducen inflamación.

30 Hasta la fecha no existen terapias específicas para NASH o la fibrosis y actualmente solo se proporcionan recomendaciones de salud a los pacientes. Estas incluyen la reducción de peso, comer una dieta equilibrada y saludable, aumentar la actividad física, y evitar el alcohol y medicamentos innecesarios. La pérdida de peso puede mejorar las pruebas hepáticas del suero en algunos pacientes con NASH y puede mejorar la evidencia del daño hepático histológico, pero no revierte la enfermedad hepática grave. Además, se debe tener en cuenta que no todos los pacientes con NASH tienen sobrepeso.

35 Se han evaluado una variedad de enfoques experimentales, o se están evaluando en pacientes con NASH o fibrosis que incluyen, pero no se limitan a, administración de antioxidantes, como vitamina E, selenio, betaína, y agentes anti-diabéticos que incluyen metformina, rosiglitazona, y pioglitazona. Todos los resultados clínicos hasta la fecha han sido decepcionantes. En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención se puede usar en el tratamiento de NASH o fibrosis. El compuesto de la presente invención puede ser eficaz a través de la manipulación de proteínas de galectina que están implicadas en la patogénesis y progresión de enfermedades.

40 En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención (es decir, Compuesto G) tiene un efecto clínicamente significativo sobre el metabolismo del hígado graso además de la fibrosis, mientras que puede tener un efecto clínicamente más significativo en patologías relacionadas además de la inflamación y la fibrosis.

45 En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención tiene un efecto antifibrótico en el modelo de fibrosis de rata donde se induce la fibrosis por la toxina química tioacetamida (TAA) que tiene una patología similar al efecto del consumo crónico de alcohol que da lugar a la fibrosis, cirrosis y aumento de la aparición de hepatocarcinoma (FIGS. 13-14).

50 En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención tiene un efecto antiinflamatorio reduciendo la secreción de TNF alfa como se representa en un modelo in vitro que usa células PBMC estresadas con endotoxina microbiana para producir TNF alfa, una citoquina principal, un biomarcador y una proteína inflamatoria (FIG. 16).

55 En base a este descubrimiento, se propone el Compuesto G como terapia sola o en combinación con otros compuestos enumerados anteriormente como tratamiento para la NASH humana. En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención se puede usar para mejorar o revertir la acumulación de grasa en hepatocitos, el infiltrado inflamatorio intra-portal e intra-lobular, y/o fibrosis, que incluye, pero no se limita a, deposición de colágeno en el espacio peri-sinusoidal, cirrosis, y para prevenir la progresión hacia carcinoma hepatocelular.

- Además de NASH, existen otras múltiples enfermedades hepáticas crónicas que dan como resultado fibrosis y pueden progresar a cirrosis. Por ejemplo, las enfermedades crónicas del hígado pueden incluir, pero no se limitan a, infección crónica por el virus de la hepatitis (hepatitis B, C, y D), abuso crónico de alcohol, enfermedades biliares (que incluyen, pero no se limitan a, colangitis esclerosante), cirrosis biliar primaria, enfermedades genéticas de almacenamiento, y enfermedades de almacenamiento de metales (que incluyen, pero no se limitan a, hemocromatosis y enfermedad de Wilson).
- 5 En algunas realizaciones, el Compuesto G puede ser eficaz en todas las enfermedades crónicas del hígado que dan lugar a fibrosis independientemente de la etiología subyacente.
- 10 En algunas realizaciones, el Compuesto G puede ser eficaz en el tratamiento de la fibrosis en órganos distintos del hígado, que incluyen, pero no se limitan a, pulmón, riñón, corazón y páncreas que se producen a través de la inflamación crónica que da lugar a la deposición de colágeno por otros tipos de células que las células estrelladas que son específicas del hígado. Las células responsables de la fibrosis en otros órganos son miofibroblastos que tienen células precursoras que incluyen, pero no se limitan a, fibroblastos residentes de tejidos, fibrocitos circulantes, o células epiteliales generadas a través de un proceso llamado EMT-transformación mesenquimatososa epitelial.
- 15 La fibrosis pulmonar puede ocurrir como resultado de un proceso inflamatorio crónico en una variedad de enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, e infecciones crónicas.
- 20 La fibrosis en el pulmón generalmente da lugar a la rigidez de los tejidos pulmonares, lo que da como resultado una función del pulmón reducida, que incluye, pero no se limita a, capacidad pulmonar total, capacidad vital, volumen espiratorio forzado, y capacidad de difusión reducidos. Estas funciones reducidas pueden dar lugar a síntomas clínicos, que incluyen, pero no se limitan a, dificultad para respirar, reducida tolerancia al ejercicio, e intercambio de gases reducido lo que da lugar a niveles de oxígeno sanguíneos bajos. El resultado final puede ser la insuficiencia pulmonar que requiere un trasplante de pulmón. No hay terapias farmacológicas actuales para la fibrosis pulmonar.
- 25 La fibrosis renal puede ocurrir como resultado de múltiples enfermedades subyacentes, que incluyen, pero no se limitan a, diabetes, obstrucción del tracto urinario, hipertensión, enfermedad vascular, y enfermedades autoinmunes.
- La fibrosis renal puede progresar para inhibir la función renal, lo que da como resultado una reducción de la producción de orina y la acumulación de metabolitos tóxicos en el torrente sanguíneo. La insuficiencia renal asociada con la fibrosis renal requiere ayuda externa mediante diálisis o trasplante de riñón. No se conocen terapias farmacológicas actuales para la fibrosis renal.
- 30 La insuficiencia cardíaca progresiva está asociada con múltiples enfermedades, que incluyen, pero no se limitan a, hipertensión crónica, enfermedad coronaria arterial, enfermedad cardíaca valvular, y enfermedad cardíaca hipertrófica. La insuficiencia cardíaca puede darse en parte debido a la deposición de tejido fibroso en el músculo cardíaco, un proceso que se ha demostrado que casualmente está asociado con un aumento de la expresión de galectina-3. La insuficiencia cardíaca progresiva puede reducir la contractilidad del corazón, la dilatación de las cámaras del corazón, producción cardíaca reducida con múltiples síntomas resultantes, como edema, dificultad para respirar, reducción de la función renal, confusión mental, y otros. En la etapa final, la insuficiencia cardíaca solo puede tratarse con dispositivos mecánicos de asistencia cardíaca o trasplante de corazón.
- 35 La inflamación crónica del páncreas más comúnmente debida, pero no exclusivamente, al abuso de alcohol, puede dar como resultado una fibrosis del páncreas y una función reducida del páncreas exocrino y endocrino. La reducción de la función exocrina puede dar lugar a una mala absorción de los alimentos y la reducción de la función endocrina puede dar lugar a trastornos endocrinos, como la diabetes. Hasta la fecha, no existen terapias farmacológicas para la fibrosis del páncreas.
- 40 Se ha demostrado que las proteínas de galectina tienen múltiples funciones en las células cancerosas, que incluyen, pero no se limitan a, aumentar la capacidad de invasión, producir resistencia a la quimioterapia, promover la metástasis, aumentar la neovascularización, y permitir la evasión del sistema inmune.
- 45 La gran mayoría de los cánceres expresan mayores cantidades de proteínas de galectina. La inhibición de las galectinas a través de la administración del compuesto de la presente invención (p. ej., el Compuesto G) puede ser eficaz en el tratamiento de los cánceres que expresan galectinas, que incluyen, pero no se limitan a, cánceres de piel (escamosos y melanomas), de boca, de cabeza y cuello, del sistema linfático, de células sanguíneas, del tracto alimentario (esófago, estómago, intestino delgado, colon y recto), de páncreas, del árbol biliar, de hígado, de pulmón, de mama, de riñón, de ovario, de testículo, de cuello uterino, de útero y del sistema neurológico.
- 50 Los aspectos de la invención se relacionan con un compuesto, o una composición que comprende el compuesto, utilizado para el tratamiento de trastornos inflamatorios y fibróticos en los que las galectinas están involucradas en la patogénesis, que incluyen, pero no se limitan a, actividad antifibrótica aumentada en órganos, que incluyen, pero no se limitan a, hígado, riñón, pulmón, y corazón. Otros aspectos de la descripción se refieren a los métodos de tratamiento de trastornos inflamatorios y fibróticos en los que las galectinas están implicadas en la patogénesis.
- 55

- 5 En algunas realizaciones, la invención se relaciona con un compuesto, una composición que tiene actividad terapéutica. Se describe en esta memoria un método para reducir la patología y actividad de la enfermedad asociada con la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) que incluye, pero no se limita a, esteatosis (acumulación de grasa en hepatocitos), degeneración en globo de los hepatocitos, infiltrado inflamatorio en el hígado, y la deposición de colágeno o fibrosis.
- 10 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un compuesto, o una composición que comprende el compuesto, utilizado en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunes en los que están implicadas las galectinas en la patogénesis, que incluyen, pero no se limitan a, artritis, artritis reumatoide, asma, y enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn).
- 15 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un compuesto, o una composición que comprende el compuesto, utilizado para aumentar la capacidad de las células T infiltrantes de tumores, que se inhiben por el efecto de las proteínas de galectina derivadas del tumor, para identificar y eliminar más eficazmente las células tumorales y, por lo tanto, frenar, detener o revertir la progresión de los tumores.
- 20 En algunas realizaciones, la invención se refiere a un compuesto, o una composición que comprende el compuesto, utilizado en combinación con inmunoterapia tumoral que puede ser una vacuna dirigida contra antígenos específicos del tumor o agentes que activan o inhiben moléculas reguladoras inmunes específicas que incluyen, pero no se limitan a, CTLA4, OX40, PD-1, o PD-L.
- 25 Se puede administrar una dosis eficaz del compuesto de la presente invención o una composición que comprende una dosis eficaz del compuesto a través de diversas rutas que incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral a través de una infusión intravenosa administrada como infusiones repetidas en bolo o como infusión constante, inyección intradérmica, subcutánea administrada como infusiones repetidas en bolo o como infusión constante, inyección intraarticular, inhalada en una formulación apropiada, u oral.
- La cantidad administrada depende de la formulación del compuesto, la ruta de administración, etc. y generalmente se determina empíricamente en ensayos de rutina, y se producirán las variaciones necesariamente dependiendo de la diana, del huésped, y de la ruta de administración, etc.
- 30 La “administración” se refiere a inyección e infusión oral, o parenteral que incluye intravenosa, subcutánea, tópica, transdérmica, intradérmica, transmucosal, intraperitoneal, intramuscular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.
- 35 Una dosis parenteral eficaz del compuesto de la presente invención a un animal experimental puede estar dentro del intervalo de 2 mg/kg hasta 200 mg/kg de peso corporal administrada por vía intravenosa. Una dosis eficaz de inyección subcutánea del compuesto de la presente invención puede estar dentro del intervalo de 2 mg/kg hasta 200 mg/kg de peso corporal, o por vía intraperitoneal de 2 mg/kg hasta 200 mg/kg de peso corporal, o por administración oral de 10 mg/kg o 50 mg/kg o 200 mg/kg o 1500 mg/kg de peso corporal. También se pueden contemplar dosis mayores y menores.
- 40 Una dosis parenteral eficaz del compuesto de la presente invención a un sujeto humano puede estar dentro del intervalo de 0,2 mg/kg hasta 20 mg/kg de peso corporal administrada por vía intravenosa. Una dosis eficaz de inyección subcutánea del compuesto de la presente invención a un sujeto humano puede estar dentro del intervalo de 0,2 mg/kg hasta 50 mg/kg de peso corporal, o por administración oral de 10 mg/kg hasta 200 mg/kg de peso corporal. Se pueden requerir dosis menores y mayores que las mencionadas anteriormente. La dosis específica y los regímenes de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el curso de la enfermedad, la afección o los síntomas, la disposición del paciente a la enfermedad, la afección o los síntomas, y el criterio del médico tratante.
- 45 Una dosis parenteral eficaz se puede administrar diariamente (en una o dividida en dosis), tres veces por semana, dos veces por semana, o mensualmente por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea o otras rutas practicadas por el profesional médico para administrar fármacos.
- 50 Se puede formular una dosis oral eficaz del compuesto de la presente invención a un animal o a un ser humano experimental con una variedad de excipientes y aditivos que mejoran la absorción del compuesto a través del estómago y del intestino delgado.
- 55 Una dosis oral eficaz podría ser 10 veces y hasta 100 veces la cantidad de la dosis parenteral eficaz.

Una dosis oral eficaz podría darse diariamente, en una o dividida en dosis, o dos veces, tres veces por semana o mensualmente.

5 El compuesto de la presente invención o composiciones que comprenden el compuesto de la presente invención se pueden administrar por vía oral; o por inyección intravenosa; o por inyección directamente en el tejido afectado, como por ejemplo por inyección en una articulación artrítica. En algunos casos, el compuesto o la composición se puede administrar por vía tópica, como en forma de gotas para los ojos, aerosoles nasales, pomadas o similares. Además, se pueden emplear otras técnicas como sistemas de distribución transdérmica, inhalación o similares.

10 En algunas realizaciones, los compuestos descritos en esta memoria se pueden coadministrar con uno o más agentes terapéuticos. En ciertas realizaciones, los agentes adicionales se pueden administrar por separado, como parte de un régimen de dosis múltiple, a partir de los compuestos de esta invención (p. ej., secuencialmente, p. ej., en diferentes horarios solapados con la administración del compuesto de la invención). En otras realizaciones, estos agentes se pueden administrar como parte de una forma de dosificación única, mezclados junto con los compuestos de esta invención en una única composición. En otra realización más, estos agentes se pueden administrar como una dosis separada que se administra aproximadamente al mismo tiempo que el compuesto de la invención. Cuando  
15 las composiciones incluyen una combinación del compuesto de esta invención y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional pueden estar presentes en niveles de dosificación entre 1 y 100%, y más preferiblemente entre 5 y 95% de la dosis normalmente administrada en un régimen de monoterapia.

20 En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto despolimerizado o de la composición puede ser compatible y eficaz en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de varios compuestos antioxidantes (p. ej., glicirricina, ácido ascórbico, L-glutation, cisteamina, etc.) como se describe en la Patente de E.E.U.U. Nº 7.078.064.

25 Una dosis eficaz administrada a un sujeto animal o ser humano con NASH o fibrosis hepática significa la cantidad de un compuesto que, solo o en combinación con la cantidad de otro agente terapéutico, cuando se administra como una formulación parenteral, subcutánea, inhalada, intraarticular, ocular, u oral da como resultado al menos una reducción del 10% en la grasa hepatocelular, en hepatocitos con degeneración en globo, en infiltrado celular inflamatorio, al menos una reducción de un punto en el recuento de actividad NAFLD, o al menos una reducción del 10% en la deposición de colágeno en el hígado evaluada mediante tinción histológica con rojo Sirio, o ralentizando la progresión de la deposición de tejido fibrótico en el hígado en al menos un 10%.

30 Una dosis eficaz administrada a un sujeto humano con NASH y fibrosis hepática puede dar como resultado una reducción de al menos un 10% en los biomarcadores séricos asociados con NASH, o una mejora de al menos un 10% en el contenido en grasa del hepatocito o la rigidez del hígado según lo evaluado mediante ultrasonido o elastografía por RM, o una mejora de al menos un 10% en las pruebas de función hepática que miden la función metabólica o la derivación en el hígado, o una reducción de al menos un 10% en los síntomas y complicaciones  
35 clínicos que se dan como resultado la fibrosis y cirrosis hepática que incluyen, pero no se limitan a, síntomas y complicaciones que se dan como resultado de procesos metabólicos y de eliminación reducidos (que incluye, pero no se limitan a, bilirrubina), reducción de la capacidad sintética del hígado (que incluye, pero no se limita a, albúmina y proteínas de la coagulación), hipertensión portal, y encefalopatía hepática.

40 Una dosis eficaz administrada a un sujeto humano con NASH y fibrosis hepática significa una mejora en los parámetros clínicos o una progresión reducida de los parámetros clínicos cuando se compara con un grupo no tratado control de sujetos humanos que incluyen, pero no se limitan a, al menos una reducción del 10% en los biomarcadores séricos asociados con NASH, o al menos una mejora del 10% en el contenido de grasa del hepatocito o la rigidez hepática según lo evaluado mediante ultrasonidos o elastografía por RM, o al menos una mejora del 10% en las pruebas de función hepática que miden la función metabólica o la derivación en el hígado, o  
45 al menos una reducción del 10% en los síntomas clínicos y las complicaciones que resultan de la fibrosis y la cirrosis hepática que incluye, pero no se limita a, síntomas y complicaciones que resultan de procesos metabólicos y de eliminación reducidos (que incluyen, pero no se limitan a bilirrubina), capacidad sintética hepática reducida (que incluye, pero no se limita a albúmina y proteínas de la coagulación), hipertensión portal, y encefalopatía hepática.

50 Una dosis eficaz administrada a un sujeto animal o humano con fibrosis o cirrosis hepática debida a un trastorno diferente de NASH significa la cantidad de un compuesto que, solo o en combinación con la cantidad de otro agente terapéutico, cuando se administra como una formulación parenteral, subcutánea, inhalada, intraarticular, ocular, u oral da como resultado, por ejemplo, una reducción de al menos un 10% en la deposición de colágeno en el hígado evaluada mediante tinción histológica con rojo Sirio, o retardando la progresión de la deposición de tejido fibrótico en el hígado en al menos un 10%.

55 Una dosis eficaz administrada a un sujeto humano con fibrosis o cirrosis hepática debida a un trastorno distinto de NASH significa que la cantidad de compuesto que, solo o en combinación con una cantidad de otro agente terapéutico, cuando se administra como una formulación parenteral, subcutánea, inhalada, intraarticular, ocular, u oral da como resultado, pero no se limita a, una reducción de al menos un 10% en los biomarcadores séricos asociados con fibrosis hepática, o al menos una mejora del 10% de la rigidez hepática según lo evaluado mediante

5 ultrasonidos o elastografía por RM, o al menos una mejora del 10% en las pruebas de función hepática que miden la función metabólica o la derivación en el hígado, o al menos una reducción del 10% en los síntomas clínicos y las complicaciones que resultan de la fibrosis y la cirrosis hepática que incluyen, pero no se limitan a, síntomas y complicaciones que resultan de la fibrosis y cirrosis hepática, que incluyen, pero no se limitan a, síntomas y complicaciones que resultan de procesos metabólicos y de eliminación reducidos (que incluyen, pero no se limitan a bilirrubina), capacidad sintética hepática reducida (que incluye, pero no se limita a albúmina y proteínas de la coagulación), hipertensión portal, y encefalopatía hepática.

10 Una dosis eficaz dada a un sujeto humano con fibrosis o cirrosis hepática debida a un trastorno diferente a NASH significa una mejora en los parámetros clínicos o una reducida progresión de los parámetros clínicos cuando se compara con un grupo no tratado control de sujetos humanos, que incluyen, pero no se limitan a, una reducción de al menos un 10% en los biomarcadores séricos asociados con fibrosis, o al menos una mejora del 10% en la rigidez hepática según lo evaluado mediante ultrasonidos o elastografía por RM, o al menos una mejora del 10% en las pruebas de función hepática que miden la función metabólica o la derivación en el hígado, o al menos una reducción del 10% en los síntomas clínicos y las complicaciones que resultan de la fibrosis y la cirrosis hepática que incluyen, pero no se limitan a, síntomas y complicaciones que resultan de la fibrosis y cirrosis hepática, que incluyen, pero no se limitan a, síntomas y complicaciones que resultan de procesos metabólicos y de eliminación reducidos (que incluyen, pero no se limitan a bilirrubina), capacidad sintética hepática reducida (que incluye, pero no se limita a, albúmina y proteínas de la coagulación), hipertensión portal, y encefalopatía hepática.

20 Una dosis eficaz dada a un sujeto animal o humano con fibrosis renal significa una mejora en los parámetros clínicos o una reducida progresión de los parámetros clínicos cuando se compara con un grupo no tratado control de sujetos animales o humanos, que incluyen, pero no se limitan a, una reducción de al menos un 10% en la fibrosis renal evaluada mediante histología, o al menos una mejora del 10% en la proteinuria, o al menos una mejora del 10% en la tasa de filtración glomerular, o al menos una mejora del 10% en los signos y síntomas clínicos relacionados con la insuficiencia renal.

25 Una dosis eficaz dada a un sujeto animal o humano con fibrosis pulmonar significa una mejora en los parámetros clínicos o una reducida progresión de los parámetros clínicos cuando se compara con un grupo no tratado control de sujetos animales o humanos, que incluyen, pero no se limitan a, una reducción de al menos un 10% en el tejido fibrótico pulmonar evaluado mediante histología, mejora del 10% en los volúmenes pulmonares, o al menos una mejora del 10% en los volúmenes espiratorios, o al menos una mejora del 10% en los signos y síntomas clínicos relacionados con la insuficiencia pulmonar.

35 Una dosis eficaz dada a un sujeto animal o humano con fibrosis cardíaca significa una mejora en los parámetros clínicos o una reducida progresión de los parámetros clínicos cuando se compara con un grupo no tratado control de sujetos animales o humanos, que incluyen, pero no se limitan a, una reducción de al menos un 10% en el tejido fibrótico cardíaco evaluado mediante histología, mejora del 10% en la contractilidad del corazón, o al menos una mejora del 10% en el gasto cardíaco, o al menos una mejora del 10% en los signos y síntomas clínicos relacionados con la insuficiencia cardíaca.

40 Una dosis eficaz dada a un sujeto animal o humano con fibrosis pancreática significa una mejora en los parámetros clínicos o una reducida progresión de los parámetros clínicos cuando se compara con un grupo no tratado control de sujetos animales o humanos, que incluyen, pero no se limitan a, una reducción de al menos un 10% en el tejido fibrótico pancreático evaluado mediante histología, mejora del 5% en la síntesis o secreción de enzimas exocrinas pancreáticas, o al menos una mejora del 5% en enzimas endocrinas pancreáticas, que incluyen, pero no se limitan a, insulina, o al menos una mejora del 10% en los signos y síntomas clínicos relacionados con la insuficiencia pancreática.

45 Una dosis eficaz dada a un sujeto animal o humano con cáncer, ya sea como agente único o en combinación con otra quimioterapia, inmunoterapia contra el cáncer, o vacunas tumorales, significa una mejora en los parámetros clínicos o una reducida progresión de los parámetros clínicos cuando se compara con un grupo no tratado control de sujetos animales o humanos, que incluyen, pero no se limitan a, una reducción de al menos un 10% en el tamaño de los tumores, o una reducción de al menos un 10% en el número de metástasis cancerosas, o un aumento al menos del 10% en la actividad del sistema inmune contra las células cancerosas, o al menos una mejora del 10% en los signos y síntomas clínicos relacionados con el cáncer que incluyen, pero no se limitan a, mejora en la supervivencia sin progresión, o la supervivencia general, o la reducción de los efectos adversos de la terapia, o la mejora de la calidad de vida.

55 Aunque se han descrito varias realizaciones de la presente invención, se entiende que estas realizaciones son solo ilustrativas y no restrictivas, y que pueden ser evidentes muchas modificaciones y/o realizaciones alternativas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede realizar cualquier etapa en cualquier orden deseado (y se puede añadir cualquier etapa deseada y/o se puede eliminar cualquier etapa deseada). Por lo tanto, se entenderá que las reivindicaciones adjuntas están destinadas a cubrir todas las modificaciones y realizaciones que se encuentran dentro del espíritu y el alcance de la presente invención.

La invención se describirá además en los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes de esta invención.

### Ejemplos

5 Para referencia, el producto selectivamente despolimerizado de la presente invención (Compuesto G) se refiere a un compuesto preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 descrito en esta memoria, el Compuesto D se refiere a un polisacárido de referencia preparado de acuerdo con los métodos descritos en la Patente de E.E.U.U. N° 7.893.252. El compuesto H se refiere a un polisacárido de pectina despolimerizado de alto peso molecular (90.000 a 140.000 D), uno no preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 descrito en esta memoria, sino más bien preparado de acuerdo con los métodos descritos en la Patente de E.E.U.U. N° 8.236.780. El Compuesto S se refiere a un polisacárido fabricado a partir de pectina Citrus USP de acuerdo con los métodos descritos en la Patente de E.E.U.U. N° 8.128.966. La descripción proporciona el proceso de fabricación de pectina modificada, y su uso en el tratamiento del cáncer. El Compuesto T se refiere a un "Polvo de pectina fraccionada Thorne Research 5 OZ" MCP comercial comprado en Amazon.com.

#### Ejemplo 1: Fabricación del Compuesto G

15 El producto selectivamente despolimerizado de la presente invención se preparó mediante un proceso ilustrado en la FIG. 1.

20 Se disolvió pectina de manzana HM USP (50 kg) y se calentó en agua a 35°-85°C. Se añadió HCl o NaOH 1 M con el fin de ajustar el pH de la solución a pH 5-7 y se mezcló bien. La mezcla se continuó durante 2 horas en el punto de ajuste 35-85°C. Se añadió NaOH o HCl 1 M según fuera necesario para reajustar el pH entre 5 y 7. Se enfrió la solución a 30°C. A 30°C se ajustó el pH entre 5 y 7.

Se añadió CuSO<sub>4</sub> a la solución de pectina con el pH ajustado para dar como resultado una concentración final de CuSO<sub>4</sub> de 1 mM. La solución de CuSO<sub>4</sub> 1 mM se mezcló durante 30 minutos a una temperatura entre 10°C y 30°C.

25 Al final de la etapa de mezcla de CuSO<sub>4</sub> 1 mM de 30 minutos, se añadieron 50 gramos de ascorbato sódico (la cantidad se precalibró para obtener el PM deseado) y se mezcló durante 5 a 20 minutos. Se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> empezando con 0,02 y hasta 1,0 moles/kg de pectina (precalibrada para el PM de pectina de partida inicial) y se mantuvo la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 4 horas (usando la prueba cuantitativa, Sigma, St-Louis) mientras el pH de la solución se mantuvo entre 4 y 7.

30 Se añadió NaOH 5 M a la solución para dar como resultado una solución de pH entre 8 y 10. La solución de pH ajustado se mezcló durante 10-30 minutos. Luego se añadió HCl concentrado a la solución de pH ajustado para ajustar el pH de la solución entre 4 y 5. La solución, una vez ajustada a pH entre 4 y 5 se puede mantener mezclando durante 2 a 24 horas entre 2°C y 8°C.

Luego se calentó la solución a 80°C durante 30-180 minutos y se añadió 1-5 kg de Filter-Aid (Celite) a la solución, y la solución con Celite añadido se agitó durante 30 minutos y luego se filtró. Se descartaron los sólidos resultantes de la filtración.

35 El filtrado se concentró 1,5-3x a vacío, y luego se ajustó el pH entre 3 y 5. Se añadió etanol o isopropanol caliente en un 50% en peso. La mezcla se agitó de 1-2 horas para precipitar el producto, y luego se filtró la mezcla. Se desechó el filtrado, lo que dejó un precipitado blanco a blanquecino.

40 Se añadió EtOH al 96% frío a la solución y la suspensión resultante se agitó luego durante 30 minutos. Se filtró la solución y se desechó el filtrado. Se repitió la etapa de suspensión con EtOH al 96%, seguido de una filtración final y la recuperación de un precipitado blanco a blanquecino.

El producto final de este proceso rinde una composición con la estructura molecular general mostrada en la FIG. 2, según lo evaluado por los análisis descritos en los Ejemplos 2, 3, 4, y 5 a continuación.

#### Ejemplo 2: Análisis del peso molecular promedio mediante MALLS

45 Se puede usar un sistema de detección de Dispersión de Luz Multi-ángulo para generar un gráfico ZIMM que predice independientemente el peso molecular de los polímeros. El principio del método MALLS se basa en el hecho de que la luz se dispersa más fuertemente por moléculas grandes que por moléculas pequeñas. La salida del detector de dispersión de luz es proporcional al producto de la concentración por el peso molecular promedio de las macromoléculas. Por lo tanto, la forma del pico de dispersión de luz es asimétrica. Se obtiene el peso molecular frente al volumen de elución y se pueden calcular los pesos moleculares promedio y las distribuciones del peso molecular promedio.

La Tabla 1 a continuación y las FIGS. 3A-3B ilustran una determinación del peso molecular promedio de un compuesto selectivamente despolimerizado de la presente invención mediante MALLS, lo que indica un peso molecular promedio de aproximadamente 37 kilodaltons (kD) en solución de tampón EDTA con una desviación estándar del 8%.

Tabla1

Número de Estudio	Identificación de la muestra	Resultados (Daltons)
3098-003	3098-003-00001 (EDTA)	36.950 [STD 8%]

## Ejemplo 3: Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

5 La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) es una técnica bien establecida que usa HPLC para la caracterización de polímeros. La SEC en combinación con la detección del índice de refracción (IR) se usa para la determinación de pesos moleculares promedio de carbohidratos poliméricos mediante el perfil del tiempo de retención. La FIG 4a demuestra el tiempo de elución de polisacáridos estándar y la FIG 4b muestra el perfil de peso molecular del Compuesto G.

10 A partir de este análisis y como se muestra en la FIG 4b, el intervalo de peso molecular del Compuesto G es de 20 a 70 kDa.

## Ejemplo 4: Determinación de la composición glicosílica del Compuesto G

El análisis de la composición glicosílica se realizó mediante cromatografía de gases combinada seguida de espectrometría de masas (GC/MS) de los derivados per-*O*-trimetilsililo (TMS) de los metilglicósidos monosacáridos producidos a partir de la muestra por metanolisis ácida.

15 Se tomó una alícuota de cada muestra y se añadió a un tubo con 20 µg de inositol como estándar interno. Luego se prepararon metilglicósidos a partir de la muestra seca después de la metanolisis en HCl 3M en metanol a 80°C (6 horas), seguido de re-*N*-acetilación con piridina y anhídrido acético en metanol (para la detección de amino azúcares). La muestra se somete después a per-*O*-trimetilsililación por tratamiento con Tri-Sil (Pierce) a 80°C (0,3 horas). Estos procedimientos se llevaron a cabo como se describió anteriormente en Merkle y Poppe (1994)

20 *Methods Enzymol.* 230: 1-15; York, et al. (1985) *Methods Enzymol.* 118: 3-40. El análisis de GC/MS de los metilglicósidos TMS se realizó en un AT 6890N GC interconectado a un 5975B MSD, usando una columna capilar de sílice fundida Supelco EC-1 (30 m x 0,25 mm ID).

Los resultados del análisis de la composición se enumeran en la tabla a continuación:

Tabla 2

25 % en moles de residuos monosacáridos del Compuesto G mediante GC-MS

Muestra	Residuo glicosílico	Masa (g)*	% por mol <sup>1</sup>
Comp. G	Arabinosa (Ara)	13,4	5,6
Lote #	Ramnosa (Rha)	9,0	3,4
S126K4208	Fucosa (Fuc)	n.d.	-
	Xilosa (Xyl)	5,2	2,2
	Ácido glucurónico (GlcA)	n.d.	-
	Ácido galacturónico (GalA)	220,8	71,7
	Manosa (Man)	n.d.	-
	Galactosa (Gal)	45,4	15,9
	Glucosa (Glc)	3,3	1,2
	N-acetilGalactosamina (GalNAc)	n.d.	-
	N-AcetilGlucosamina (GlcNAc)	n.d.	-
	N-AcetilManosamina (ManNAc)	n.d.	-

	Total	297,1	CHO=99%
--	-------	-------	---------

\*No se ha determinado la desviación estándar del ensayo.

Ejemplo 5: Determinación de las uniones glicosídicas y estructura mediante RMN H1 y C13

5 La espectroscopía de RMN revela señales y enlaces moleculares individuales, lo que proporciona un tipo de huella digital analítica para moléculas de carbohidratos complejos. Se evaluaron los espectros bidimensionales de RMN para revelar la huella digital molecular de la composición de la presente invención, el Compuesto G, y la comparación con el Compuesto S.

10 Para la espectroscopía de RMN, las muestras del Compuesto G y del Compuesto S se disolvieron en 0,7 ml de D<sub>2</sub>O (99,96% D), y se transfirieron a un tubo de 5 mm de RMN (Wilmad). Los espectros de RMN de protón 1-D y TOCSY 2-D, NOESY, COSY con gradiente mejorado (gCOSY), HSQC, y gHMBC se adquirieron en un espectrómetro Varian Inova-500 MHz a 343 K (70°C). Los desplazamientos químicos se midieron en relación con la acetona interna (oH=2,225 ppm, oC=31,07 ppm).

La Tabla 3 a continuación indica las proporciones aproximadas entre metil galacturonato y ácido galacturónico, y entre metil galacturonato y ácido galacturónico y galactosa, obtenidas a partir de RMN 2-D HSQC del Compuesto G:

Tabla 3

	Compuesto G	SD*
GalA-6-OMe/GalA	1:2	
GalA(-6-OMe)/Gal	2:1	

15 Los componentes principales en el Compuesto G son ácido galacturónico ligado en 4, metil galacturonato ligado en 4, y galactosa ligada en 4. Está claramente presente la ramnosa en el espectro HSQC. La Tabla 4 contiene la asignación espectral de RMN del Compuesto G.

Tabla 4

Residuo		Posición					
		1	2	3	4	5	6
4- $\alpha$ -GalAp	<sup>1</sup> H	5,08	3,77	3,98	4,42	4,69	
	<sup>13</sup> C	100,0	69,5	69,9	79,3	72,3	175,9
4- $\alpha$ -GalApOMe <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H	4,92	3,75	3,99	4,47	5,10	
	<sup>13</sup> C	100,8	69,5	69,9	79,3	71,5	172,1
4- $\beta$ -Galp	<sup>1</sup> H	4,62	3,69	3,77	4,16	3,72	3,81/3,73
	<sup>13</sup> C	105,5	73,1	74,2	78,5	75,4	61,7
t- $\alpha$ -Araf	<sup>1</sup> H	5,17	4,13	3,97	4,06	3,83/3,73	
	<sup>13</sup> C	107,8	82,0	77,4	84,8	62,1	
5- $\alpha$ -Araf	<sup>1</sup> H	5,08	4,14	4,02	4,21	3,88/3,80	
	<sup>13</sup> C	108,6	82,0	77,7	83,2	67,6	
Rhap	<sup>1</sup> H	n.d.	n.d.	3,89	3,40	3,79	1,25
	<sup>13</sup> C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,6

20 <sup>a</sup> resonancia del metilo: 3,81/53,9 ppm

La FIG 5a muestra el espectro bidimensional de RMN para el Compuesto G y la FIG 5b muestra el espectro bidimensional de RMN del Compuesto S.

La comparación de espectros bidimensionales de RMN de diferentes muestras de material de pectina modificada es un método poderoso para evaluar diferentes estructuras.

5 La FIG 5c muestra los espectros superpuestos del Compuesto G y del Compuesto S, que revela las marcadas diferencias en los espectros bidimensionales de RMN de estos dos compuestos. Las posiciones que están dentro de un círculo están en el espectro del Compuesto G, pero no el Compuesto S. Esto indica importantes diferencias estructurales entre el Compuesto G y el Compuesto S.

10 Este análisis demuestra claras diferencias estructurales entre el Compuesto G y el Compuesto S, producidas por un método de fabricación diferente. Estas diferencias estructurales son evidentes en los análisis bidimensionales de RMN cuando el análisis de composición química, que mide solamente la composición de monosacáridos, no muestra grandes diferencias.

La huella dactilar por RMN bidimensional se puede incluir en el certificado de análisis por lotes de GMP del Compuesto G como una evaluación precisa de la compleja estructura molecular.

Ejemplo 6: Determinación de la citotoxicidad del Compuesto G en líneas celulares cultivadas

15 Una de las características destacadas de los compuestos de pectina modificada que se han informado (E.E.U.U. 8.128.966 y E.E.U.U. 2012/0149658) es su citotoxicidad en líneas celulares de varios tipos, que incluye la inducción de apoptosis. Por ejemplo, la Patente de E.E.U.U. 8.128.966 describe pectinas modificadas que inducen apoptosis en células cancerosas, como la línea celular de melanoma B16-F10.

20 A diferencia de los resultados de la Patente de E.E.U.U. 8.128.966, la pectina modificada de la presente invención se demostró que no tenía citotoxicidad cuando se usa en una variedad de líneas celulares, que incluyen células de melanoma B16-F10.

La línea celular hepática estrellada humana, LX-2, se usa habitualmente como una herramienta para el análisis de la fibrosis hepática. Las células LX-2 proliferan normalmente en medios ricos en suero FC al 2%. Sin embargo, una vez en el suero FC al 0,1% de estrés, las células LX-2 pasan por cambios patológicos similares a los establecidos en el hígado fibrótico. La citotoxicidad se evaluó usando el Compuesto D, el Compuesto H, y el Compuesto G.

25 La FIG 6a muestra los resultados de un ensayo de proliferación celular utilizando la incorporación timidina marcada con tritio dentro de las células LX-2 en crecimiento. No hubo diferencia con las células de control en la incorporación de timidina a las 48 horas de cultivo cuando las células se incubaron con 1 mg/ml del Compuesto D, Compuesto H, o Compuesto G.

30 La FIG 6b muestra los resultados de un ensayo de viabilidad celular que utiliza un colorante vital que es captado por las células no viables y excluido en las células viables. No hubo diferencia con las células de control en la viabilidad celular a las 48 horas de cultivo cuando las células se incubaron con 1 mg/ml del Compuesto D, Compuesto H, o Compuesto G.

35 También se evaluó la presencia de apoptosis usando el kit de apoptosis de anexina (eBioscience). Las anexinas son una familia de proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio que se unen preferentemente a fosfatidilserina (PS). En condiciones fisiológicas normales, la PS está localizada predominantemente en la cara interna de la membrana plasmática. Al inicio de la apoptosis, la PS pierde su distribución asimétrica a través de la bicapa de fosfolípidos y se transloca a la cara de la membrana extracelular lo que marca a las células como dianas de fagocitosis. Una vez en la superficie exterior de la membrana, la PS se puede detectar fluorescentemente unida a Anexina V de una manera dependiente de calcio.

40 La FIG 6c muestra los resultados de análisis de FACS (Separación de células activadas mediante fluorescencia) de células LX-2 para evaluar la apoptosis que no mostraron evidencia de apoptosis en células tratadas con el Compuesto D o el Compuesto G frente a células control (tratadas con vehículo).

45 Como prueba adicional para la apoptosis, se examinaron células LX-2 para la presencia de fragmentación de ADN. La FIG 6d muestra que no existe evidencia de fragmentación de ADN en células tratadas con el Compuesto D (D1 o D2), el Compuesto H o el Compuesto G en comparación con el control.

50 Los macrófagos están integralmente implicados en los procesos inflamatorios y fibróticos. Por lo tanto, se evaluó una línea celular de macrófagos THP-1 (Número de ATCC®: TIB-202™) para determinar el efecto del Compuesto G sobre la citotoxicidad como se muestra en la FIG. 7. La línea celular THP-1 es una línea celular de tipo monocito extraída de sangre periférica de paciente (Homo sapiens) con Leucemia Monocítica Aguda (AML) (véase Tsuchiya S, et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. Cancer Res. 42: 1530-1536, 1982).

Las células THP-1 se suspendieron en medio de ensayo que contenía FBS al 10%. Se transfirieron aproximadamente 25.300 células/pocillo a placas de 96 pocillos de 100 µl/pocillo. A las 24 horas, se cambió el medio de cultivo con medio fresco y se incubaron las células durante toda la noche. Los compuestos de ensayo se

diluyeron serialmente en medio de ensayo que contenía FBS al 10% y se transfirieron 100  $\mu$ l/pocillo a las células de monocitos THP-1 en crecimiento. El volumen final de ensayo fue de 200  $\mu$ l/pocillo que contenía FBS al 10%, Gentamicina 2X, y los siguientes artículos de prueba: el Compuesto G de la presente invención y el Compuesto D, un producto de galactomanano o en presencia de digitoxina. Las células se incubaron durante 3 días con los artículos de prueba. Después de eliminar 50  $\mu$ l de sobrenadante para otras pruebas, se midió la citotoxicidad/crecimiento añadiendo 15  $\mu$ l de "Solución acuosa One CellTiter 96®" de Promega a los 96 pocillos y se monitorizó la viabilidad a una DO a 490 nm después de 1-7,5 horas. El ensayo de proliferación de Solución acuosa One CellTiter 96® es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación, citotoxicidad o quimiosensibilidad. El reactivo de Solución acuosa One CellTiter 96® contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrón (fenazina etosulfato; PES). El PES ha mejorado la estabilidad química, lo que le permite combinarse con el MTS para formar una solución estable para la detección de la viabilidad celular en medios de cultivo in vitro.

La FIG 7 muestra que cantidades crecientes del Compuesto G aplicadas a las células THP-1 no dieron lugar a citotoxicidad.

Previamente se usó la línea celular de melanoma B16-F10 como un ensayo para determinar la actividad de pectinas modificadas. Por lo tanto, se evaluaron las células B16-F10 para determinar el efecto del Compuesto G sobre la citotoxicidad.

La línea celular de melanoma B16-F10 (Número de ATCC®: CRL-6475™) es una mezcla de células con forma de huso y de tipo epitelial a partir de piel de melanoma de ratón (*Mus musculus*, Cepa: C57BL/6J (Véase Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* 35: 218-224, 1975).

Se transfirieron células de melanoma B16-F10 a medio fresco (DMEM-Suero Bovino Fetal al 10%- FBS). Se transfirieron aproximadamente 2.900 células/pocillo (pase #4) en 100  $\mu$ l/pocillo a placas de 96 pocillos para la incubación durante toda la noche. A las 24 horas se cambió el medio de cultivo con medio fresco libre de suero y se incubó durante toda la noche. Se diluyeron serialmente los compuestos de prueba en medio de ensayo que contiene FBS al 1% y se transfirieron 100  $\mu$ l/pocillo a las células de melanoma en crecimiento. El volumen final de ensayo era de 200  $\mu$ l/pocillo que contenía FBS al 1%, Gentamicina 2X, y el Compuesto G de la presente invención, el Compuesto D, un producto de galactomanano o 5-fluorouracilo. Las células se incubaron durante 3 días con los compuestos de prueba. Se midió la citotoxicidad/crecimiento añadiendo 20  $\mu$ l de "Solución acuosa One CellTiter 96®" de Promega a los 96 pocillos y se monitorizó la viabilidad a una DO a 490 nm después de 1 hora. El ensayo de proliferación de Solución acuosa One CellTiter 96® es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación, citotoxicidad o quimiosensibilidad. El reactivo de Solución acuosa One CellTiter 96® contiene un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrón (fenazina etosulfato; PES). El PES ha mejorado la estabilidad química, lo que le permite combinarse con el MTS para formar una solución estable para la detección de la viabilidad celular en medios de cultivo in vitro.

La Figura 8 muestra que cantidades crecientes del Compuesto G aplicadas a células B16-F10 no dieron como resultado citotoxicidad. Esto representa una clara diferencia de la función de otros compuestos de pectina modificada descritos anteriormente.

Las células PBMC son células primarias extraídas de sangre completa usando ficoll, un polisacárido hidrófilo. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) están integralmente implicadas en procesos inflamatorios y fibróticos. Por lo tanto, se evaluaron células PBMC para determinar el efecto del Compuesto G sobre la citotoxicidad.

La Figura 9 muestra que el Compuesto G de tres lotes diferentes aplicado a PBMCs no dieron como resultado citotoxicidad. El Compuesto G a concentraciones de hasta 500  $\mu$ g/ml no tuvo efecto en el crecimiento de PBMC. La citotoxicidad se midió usando el ensayo de MTS (Ensayo de proliferación celular de solución acuosa One CellTiter 96® de Promega, E.E.U.U.).

La Figura 10 muestra que cantidades crecientes del Compuesto G aplicadas a células de fibroblastos de pulmón cultivadas no dieron como resultado citotoxicidad. La línea celular MRC-5 es un fibroblasto normal que se derivó de tejido pulmonar normal (*Homo sapiens* (humano) macho (Nº Catálogo de ATCC CCL-171™). Se probaron cantidades crecientes de los siguientes artículos de prueba: el Compuesto G de la presente invención, el Compuesto D, un producto de galactomanano usando el Ensayo de proliferación celular de solución acuosa One CellTiter 96® (MTS) -Promega E.E.U.U. La Figura 10 muestra que el Compuesto G hasta 800  $\mu$ g/ml no tuvo efecto en el crecimiento de fibroblasto de pulmón in vitro.

El resumen de estos datos muestra convincentemente que el Compuesto G no es citotóxico para las células y no induce apoptosis. Esto contrasta con todos los demás informes de materiales de pectina modificados informados.

Ejemplo 7: Ensayo in vitro para el efecto antiinflamatorio usando células primarias PBMC

Se evaluó el Compuesto G por su actividad biológica en afecciones inflamatorias. En el proceso inflamatorio están implicadas y activadas múltiples células. Un tipo de célula clave en este proceso son las Células Mononucleares de Sangre Periférica (PMBCs), una célula primaria que se usa habitualmente como modelo antiinflamatorio in vitro, que se activa mediante mediadores inflamatorios, son reclutadas a los sitios de inflamación, se transforman en macrófagos tisulares, y aumentan el proceso inflamatorio. Por lo tanto, se usaron las PMBCs como un modelo in vitro para evaluar el efecto del Compuesto G.

El ensayo in vitro para la inflamación se desarrolló estresando PBMC con endotoxina microbiana (lipopolisacáridos microbianos) y midiendo por secreción de TNF alfa, una citoquina principal y biomarcador de inflamación. Se resuspendieron PBMC en medio de ensayo que contenía FBS al 10% (Gibco lot#749413), Gentamicina 2X, y L-glutamina. Se transfirieron 90 µl/pocillo de las PBMC a una placa de ensayo (169.000 células/pocillo). Se añadieron 90 µl/pocillo de medio de ensayo a la placa de ensayo hasta un volumen total de 180 µl/pocillo durante aprox. 16 horas. El LPS (toxina microbiana) se diluyó serialmente en medio de ensayo. Se añadieron 20 µl/pocillo de LPS a la placa de ensayo hasta un volumen total de 200 µl/pocillo y se incubó durante 7 horas a 37 grados C. Se sacaron 60 µl/pocillo para el ensayo de ELISA de TNF-α (Factor Nuclear Transformante alfa). Las muestras de 60 µl se diluyeron 1:4 con diluyente de ELISA (el volumen total es de 240 µl) y se transfirieron 100 µl/pocillo a una placa de ELISA. Se analizó el h-TNF-α usando un kit de Desarrollo de ELISA (PreproTech, cat# 900-K25, lot# 0509025), con TNF-α humano como estándar en una placa de ELISA. Se añadieron 100 µl/pocillo de Sustrato Líquido de ABTS a cada pocillo y se leyó la DO a 405 nm con una corrección de longitud de onda establecida a 650 nm.

El esquema de la placa usado se expone a continuación:

Esquema de Placa:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	EST. de h-TNFα; 5 ng/ml (1:2)	LPS; 400 ng/ml (1:2)						EST. de h-TNFα; 5 ng/ml (1:2)					
B													
C		Compuesto S; 1,0 mg/ml (1:2), Medio de Ensayo que contiene 50 ng/ml de LPS											
D													
E		Compuesto D; 1,0 mg/ml (1:2), Medio de Ensayo que contiene 50 ng/ml de LPS											
F													
G		Compuesto G; 1,0 mg/ml (1:2), Medio de Ensayo que contiene 50 ng/ml de LPS											
H													

La FIG. 11 demuestra gráficamente los resultados de la Placa de ELISA 364 con h-TNF alfa. El Compuesto G a 0,5 mg/ml redujo el 50% de la secreción de TNF-alfa por células primarias PBMC estresadas. La reducción de la secreción de TNF-alfa es significativamente más alta que las de los polisacáridos de referencia Compuesto D o Compuesto S probados.

La capacidad del Compuesto D, Compuesto H, y Compuesto G para inhibir la secreción de TNF-alfa en PBMC se compararon directamente, como se muestra en la FIG 12. El Compuesto H se produjo usando el método descrito en la Patente de E.E.U.U. Nº 8.236.780. El Compuesto D y el Compuesto H no mostraron ninguna capacidad para reducir la secreción de TNF-alfa de células PBMC, de hecho, el Compuesto H pareció aumentar el TNF-alfa. En contraste, el Compuesto G inhibió significativamente la secreción de TNF-alfa.

Se demostró que el Compuesto G es un potente inhibidor de un modelo de inflamación in vitro. Dicha actividad demostró estar ausente en el Compuesto S o en el Compuesto H, compuestos de pectina modificada elaborados a través de diferentes procesos a partir del compuesto G. Por lo tanto, los resultados de los Ejemplos 6 y 7 mostraron que el Compuesto G es pectina modificada que tiene propiedades únicas no tóxicas y antiinflamatorias que no se describieron para otros compuestos derivados de pectina conocidos.

Ejemplo 8: Inducción in vitro de fibrogénesis en la línea celular hepática estrellada LX-2.

En otros experimentos, los inventores han demostrado que las líneas celulares estrelladas humanas cultivadas (LX-2) expresan y secretan al medio galectina-1 y galectina-3 después de estresar las células al reducir el suero FC en el medio de cultivo de 2% a 0,1%.

La línea celular hepática estrellada humana, LX-2, se usa rutinariamente como una herramienta para el análisis de la fibrosis hepática. Las células LX-2 proliferan normalmente en medio rico en suero FC al 2%. Sin embargo, una vez

que hay estrés con suero FC al 0,1% pasan por cambios patológicos similares a los establecidos en el hígado fibrótico.

5 El Compuesto G también puede modular, aumentar o disminuir las moléculas o biomarcadores de las células estrelladas LX-2 que están implicadas en la fibrogénesis, que incluyen, pero no se limitan a, colágeno I, II, III, IV, metaloproteasas, inhibidores de metaloproteasas, y citoquinas.

El Compuesto G también puede modular la expresión de citoquinas y lípidos y especies reactivas de oxígeno en macrófagos hepáticos, o células de Kupffer.

El Compuesto G también puede modular la expresión de genes hepatocelulares, ingesta y metabolismo de lípidos y especies reactivas de oxígeno.

10 Se evaluó el efecto del Compuesto G sobre la expresión de galectina-3 en los compartimentos tanto intra como extracelulares, como se muestra en la FIG 13. Mientras que los medios ricos en suero habían producido una cantidad insignificante de galectina-3, cuando se estresaron las células LX-2 (línea celular estrellada humana) con medio de cultivo depleccionado de suero de ternera fetal (en solo un 0,1% de suero), un modelo que ha demostrado ser un modelo *in vitro* para la fibrogénesis, la galectina-3 se expresó alcanzando un máximo a aproximadamente 5-7  
15 días después del cultivo en medio con suero al 0,1%. Una técnica de inmunotinción histoquímica demostró una expresión aumentada de galectina-3 en el día 6 después del estrés en suero al 0,1%, mientras que se demostró que la adición del compuesto G suprimió significativamente la expresión de galectina-3.

Ejemplo 11: Evaluación de la terapia en un modelo de fibrosis hepática inducida por TAA

20 Con el fin de determinar si el compuesto de la presente invención tiene una actividad biológica antifibrótica en animales vivos, se llevó a cabo una prueba de viabilidad preliminar *in vivo*. Se indujo una fibrosis hepática grave por toxicidad química de la administración cada dos semanas de tioacetamida (TAA). Se administró el Compuesto G IP a 90 mg/kg semanalmente durante 4 semanas, y se administró el Compuesto D a una dosis de 180 mg/kg semanalmente durante 4 semanas. El diseño experimental se muestra en la Figura 14.

25 Después de 8 semanas de tratamiento con TAA, la tinción con rojo Sirio del hígado fibrótico (control del vehículo) mostró una infiltración extensa de tejido fibrótico (FIG. 15). En contraste, el material fibrótico se redujo notablemente, y casi se eliminó en algunas áreas del hígado de un animal tratado con el Compuesto G (FIG. 15).

El análisis estadístico del grado de fibrosis y el porcentaje de colágeno se realizó con animales tratados con el Compuesto G y el Compuesto D (FIG. 16).

30 La FIG. 16 muestra una reducción estadísticamente significativa en el área fibrótica mediante análisis morfométrico digital de secciones de hígado teñidas con rojo Sirio cuando los animales se trataron con el Compuesto G y con el Compuesto D cuando se compararon con los controles del vehículo, con una mayor reducción observada con el Compuesto G cuando se compara con el Compuesto D.

Estos experimentos demuestran la actividad antifibrótica del Compuesto G, que se correlaciona con su efecto antiinflamatorio demostrado en líneas celulares.

35 Ejemplo 12: Evaluación de la terapia en un modelo NASH de hígado graso de ratón

40 Se examinó el efecto de los carbohidratos que unen galectina en la terapia de la enfermedad de hígado graso experimental NASH. Se usaron ratones STAM en los que se indujo diabetes y se administró una dieta alta en grasas como modelo experimental. Este es un modelo comprobado en el que los ratones desarrollan de forma sistemática NASH con acumulación de grasa en los hepatocitos, evidencia de toxicidad hepática, infiltrados inflamatorios portal y lobulares, fibrosis peri-sinusoidal, fibrosis avanzada con formación de nódulos, cirrosis, y, en última instancia, carcinoma hepatocelular en un cierto porcentaje de animales. Los ratones NASH se trataron cada dos semanas por vía intravenosa a las 9-12 semanas de estudio, como se muestra en la Figura 17a-b.

45 Se usaron ratones STAM para explorar el efecto del Compuesto G. En el estudio se probaron dos compuestos, el Compuesto D (como se describe en la Patente de E.E.U.U. 7.893.252) y el Compuesto G sobre los hallazgos histológicos asociados con NASH en el hígado (Figura 17). En el modelo STAM, se les administró a los ratones neonatales una inyección de estreptozotocina que da como resultado una insuficiencia pancreática endocrina y diabetes mellitus. A las cuatro semanas de edad, se introdujo una dieta alta en grasas que se continuó a lo largo del experimento. Este modelo da como resultado una enfermedad reproducible que incluye hígado graso (FL), NASH, NASH con fibrosis (Fib), formación de nódulos (N) y un cierto porcentaje de animales con carcinoma hepatocelular  
50 (HC). En este diseño experimental, se inició la terapia con fármacos a las 8 semanas y se continuó durante un total de 4 semanas. El Compuesto D se administró a una dosis de 120 mg/kg disuelto en suero salino normal por vía intravenosa dos veces a la semana. El Compuesto G se administró a una dosis de 60 mg/kg disuelto en suero salino normal por vía intravenosa dos veces a la semana.

La Figura 18 muestra que los ratones en todos los grupos ganaron peso durante el tiempo del experimento sin diferencias entre los grupos. Este resultado indica a nivel general que hubo poco efecto tóxico de los tratamientos en los animales y que cualquier cambio detectado es improbable debido a la salud general de los animales. En general, hubo 2 muertes en el grupo del vehículo (2/12, 17%) y una en el grupo tratado con el Compuesto D (1/12, 8%), todas relacionadas con la enfermedad hepática según lo determinó el examen postmortem realizado por el veterinario. No hubo muertes en el grupo tratado con el Compuesto G. Esta actividad in vivo de ausencia de toxicidad en los ratones se correlaciona con la ausencia de citotoxicidad observada en experimentos de líneas celulares in vitro.

Se usó el recuento de la actividad NAFLD para evaluar la gravedad de la enfermedad y proporciona puntos para tres aspectos de la patología de NASH que incluyen, esteatosis (0 (<5%), 1 (5-33%), 2 (33-66%), o 3 (>66%)), degeneración en globo de los hepatocitos (0 (ninguno), 1 (pocos), o 3 (muchos)), e inflamación lobular (0 (sin foco), 1 (<2 focos/campo de 200x), 2 (2-4 focos/campo de 200x), o 3 (>4 focos/campo de 200x)). El número total de puntos es el recuento de actividad NAFLD.

La Figura 19 muestra una representación gráfica con valores estadísticos del recuento de actividad NAFLD en los tres grupos experimentales. Hubo una mejora en el recuento de actividad NAFLD en animales tratados con el Compuesto G y menos efecto con el Compuesto D.

La Figura 20 muestra una representación gráfica con valores estadísticos del porcentaje de colágeno en los tres grupos experimentales. El rojo Sirio es un colorante histológico que tiene afinidad específica por fibras de colágeno, las tiñe de rojo, y por lo tanto es una herramienta cuantitativa para evaluar el grado de fibrosis en biopsias hepáticas. Se valuó el área de tinción de rojo Sirio en secciones histopatológicas de hígado de cada uno de los tres grupos de tratamiento usando análisis morfométrico asistido por ordenador. Los animales en los grupos de tratamiento temprano y tardío tuvieron una marcada reducción en el área proporcional de colágeno cuando se trataron con el Compuesto G. El tratamiento con el Compuesto D tuvo un efecto intermedio en el área proporcional de colágeno entre el control del vehículo y el Compuesto G. Estos resultados demostraron que el tratamiento con el Compuesto G reduce significativamente la fibrosis hepática en ratones con NASH.

Los resultados en los ratones NASH (Figuras 17-20) amplían y confirman los resultados encontrados en ratas tratadas con TAA sobre la fibrosis hepática. Además, estos experimentos muestran un marcado efecto antiinflamatorio del Compuesto G con una reducción en el recuento de actividad NAFLD (esteatosis, degeneración en globo de los hepatocitos e infiltrado inflamatorio). La combinación de estos efectos antiinflamatorios y antifibróticos en un modelo animal de NASH se correlaciona con el efecto antiinflamatorio demostrado en el modelo de cultivo de células PBMC.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritas en esta memoria son solo para fines ilustrativos y que deben incluirse varias modificaciones de cambios a la luz de estos dentro del espíritu y el alcance de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de arabinogalacto-ramnogalacturonano que comprende un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (GalA) ligado 1,4 y de metil galacturonato (MeGalA) ligado a heteropolímeros ramificados de oligómeros alternantes de residuos de  $\alpha$ -ramnosa ligada 1,2 y de  $\alpha$ -GalA ligado 1,4, los residuos de ramnosa llevan una ramificación primaria de oligómeros de residuos de 1,4- $\beta$ -D-galactosa, de residuos de 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa, o combinaciones de los mismos,
- 5 en donde el oligómero de residuos de 1,4- $\beta$ -D-galactosa, residuos de 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa o combinaciones de los mismos representan al menos un 8 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos,
- en donde el compuesto tiene un grado de metoxilación que varía de 40% a 70%,
- 10 en donde el compuesto tiene una proporción entre metil galacturonato y ácido galacturónico que varía de 2:1 a 1:2, y
- en donde el compuesto es capaz de reducir la secreción de la citoquina TNF-alfa a partir de monocitos estresados con endotoxina.
2. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto es capaz de reducir la secreción de TNF alfa por monocitos/macrófagos activados en al menos un 25%.
- 15 3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde i) el esqueleto de residuos de ácido galacturónico ligado 1,4 y metil galacturonato representa entre el 55 al 85 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, el heteropolímero ramificado de residuos alternantes de  $\alpha$ -ramnosa ligada 1,2 y  $\alpha$ -GalA ligado 1,4 representa entre el 1 y el 6 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, el oligómero 1,4- $\beta$ -D-galactosa de la ramificación primaria representa entre el 6 al 15 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos y el oligómero 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa de la ramificación primaria representa entre el 2 al 8 por ciento molar del contenido molar total de carbohidratos, según se caracteriza mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas.
- 20 4. El compuesto de la reivindicación 1 que además comprende residuos de xilosa, glucosa, fucosa o combinaciones de los mismos.
- 25 5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene un peso molecular promedio que varía de 2 kDa a 80 kDa, de 20 kDa a 70 kDa, de 5 kDa a 55 kDa, o de 2 a 70 kDa.
6. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto tiene una proporción entre metil galacturonato más ácido galacturónico y galactosa que varía de 4:1 a 7:1.
- 30 7. El compuesto de la reivindicación 1, en donde i) el compuesto no induce una viabilidad disminuida cuando se usa para tratar células estrelladas hepáticas humanas inmortalizadas LX2 o ii) el compuesto es capaz de reducir la expresión de galectina-3 o una disminución sustancial en la secreción de galectina-3 cuando se usa para tratar células estrelladas hepáticas humanas inmortalizadas LX2 estresadas que producen galectina-3.
8. El compuesto de la reivindicación 1 en donde los residuos de 1,4- $\beta$ -D-galactosa y de 1,5- $\alpha$ -L-arabinosa están presentes en una proporción 2:1.
- 35 9. Una composición que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en formulaciones terapéuticas.
10. La composición para usar de la reivindicación 9 en donde la composición se puede administrar parenteral a través de ruta intravenosa, subcutánea, u oral.
11. La composición de la reivindicación 9 para usar que comprende además un agente terapéutico.
- 40 12. El de la reivindicación 11 para usar en donde el agente terapéutico es un compuesto antioxidante, un agente antiinflamatorio, vitaminas, un suplemento neutracéutico o combinaciones de estos.
13. La composición de la reivindicación 9 para usar en el tratamiento de esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis, trastornos inflamatorios y autoinmunes, afecciones neoplásicas, cáncer, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, o fibrosis cardíaca.
- 45 14. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto tiene una proporción entre metil galacturonato más ácido galacturónico y galactosa que varía de 4:1 a 8:1.
15. El compuesto de la reivindicación 1 en donde el compuesto está sustancialmente libre de endotoxinas microbianas, pesticidas agrícolas, herbicidas agrícolas, cobre, metales pesados, proteínas, compuestos nitrogenados o cualquier combinación de los anteriores.

Figura 1

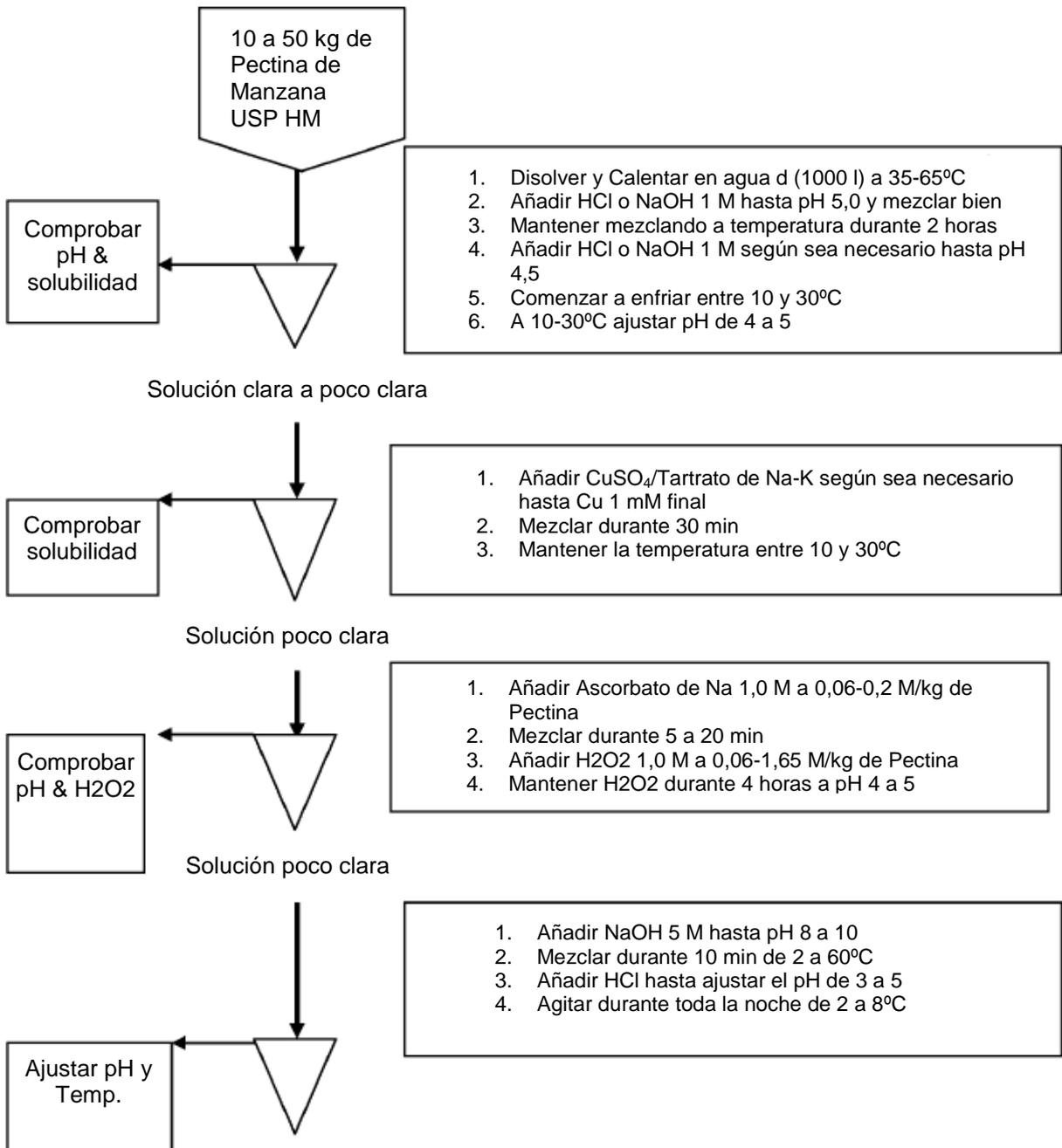


Figura 1 (Continuación)

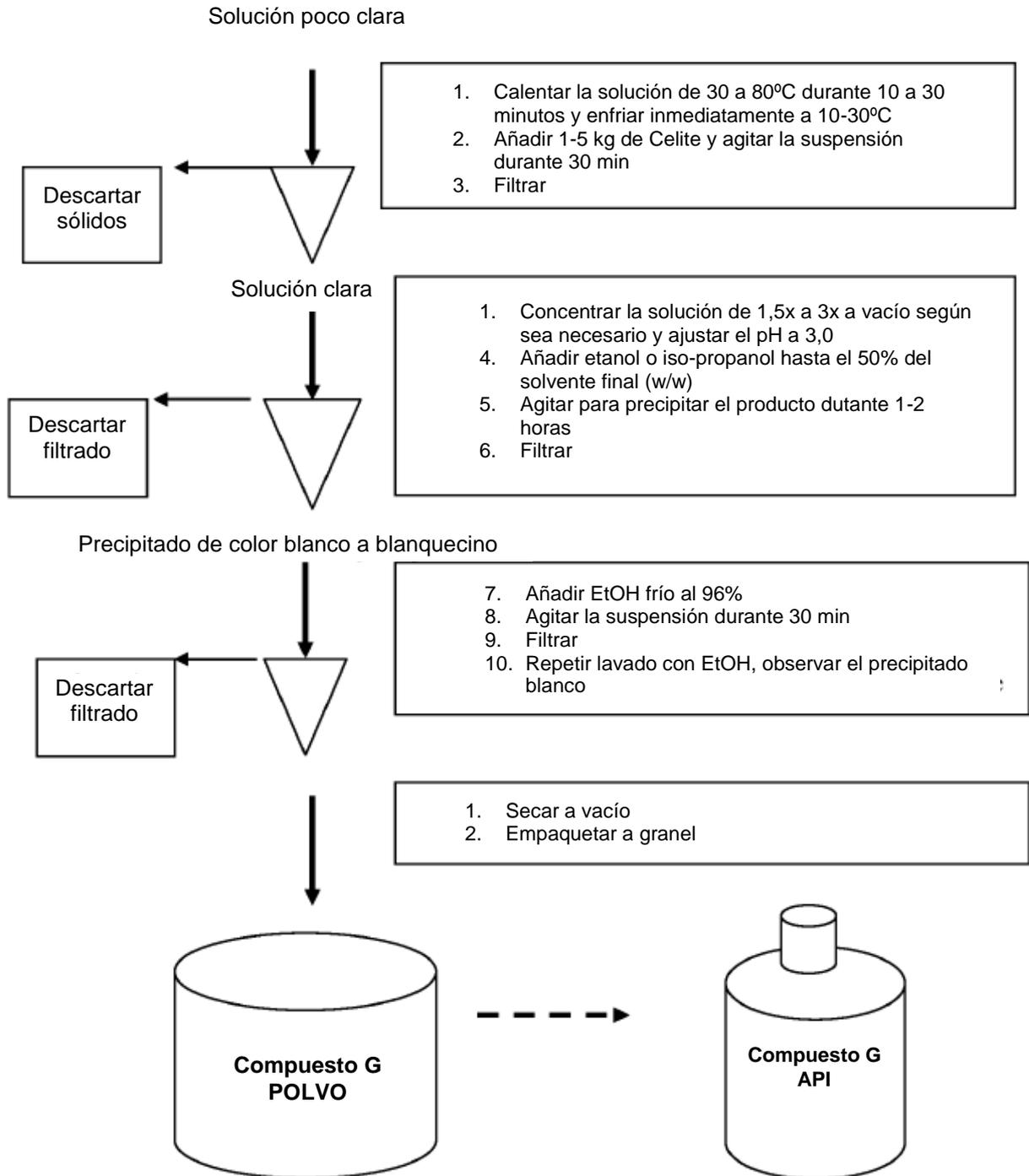


Figura 2

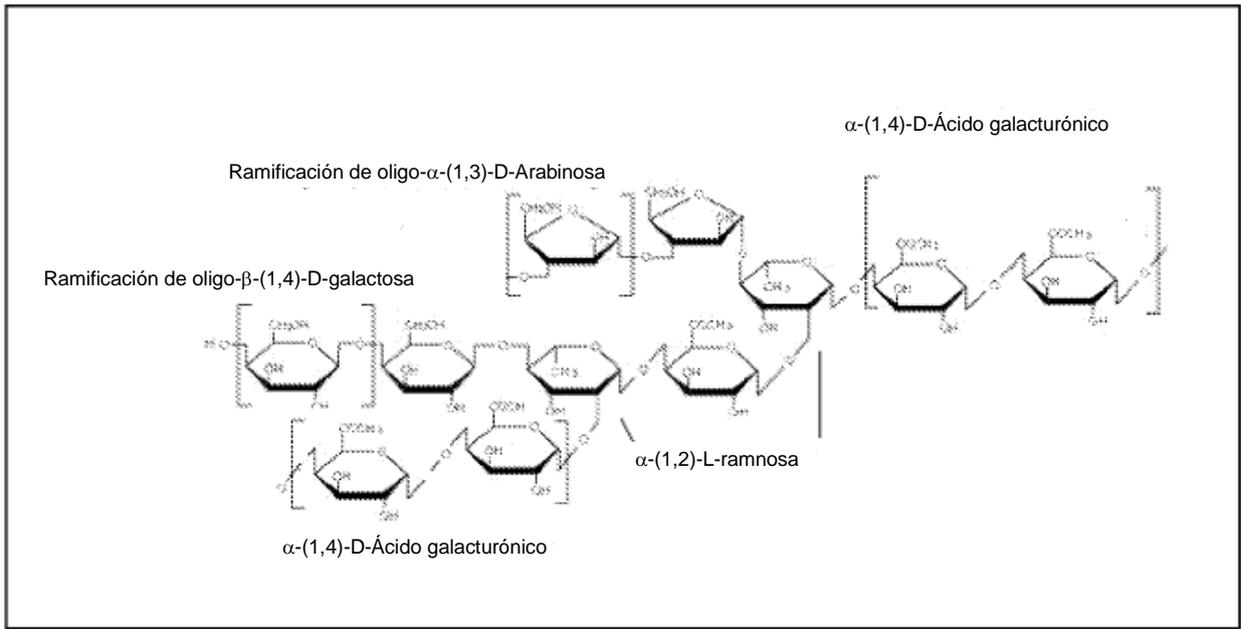


Figura 3a

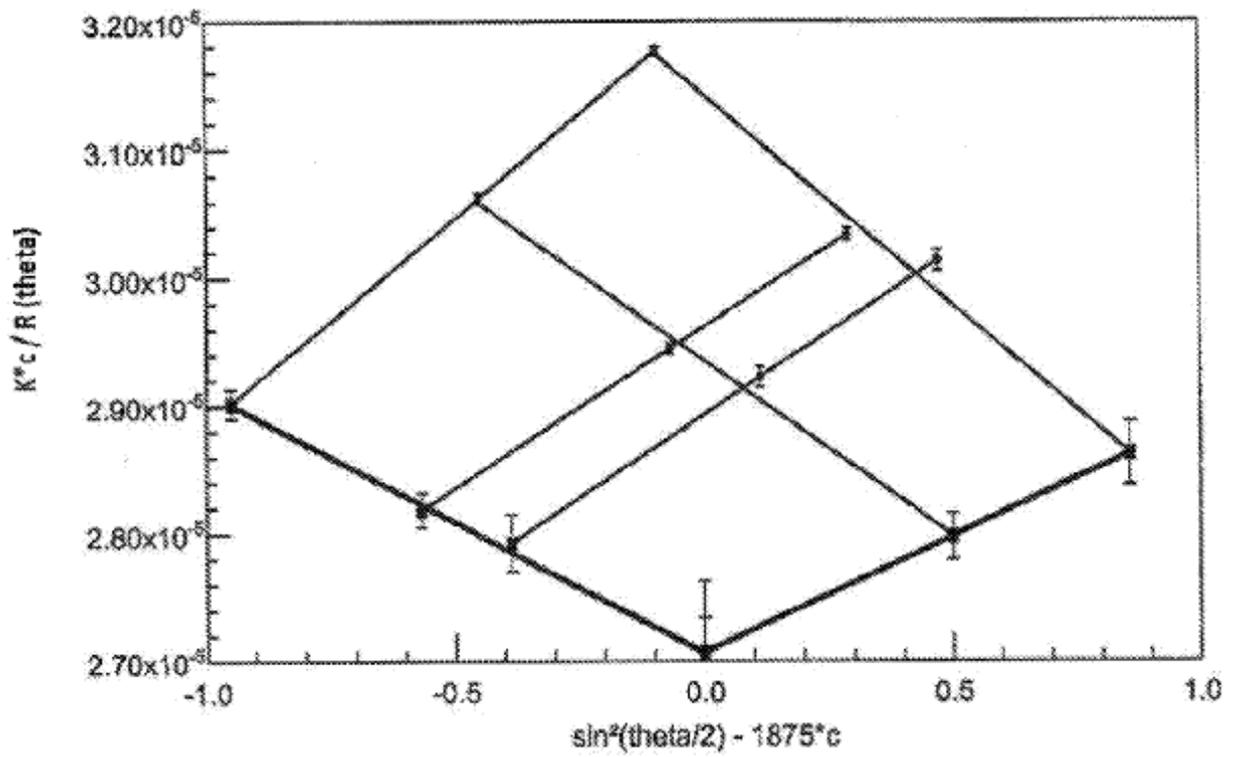
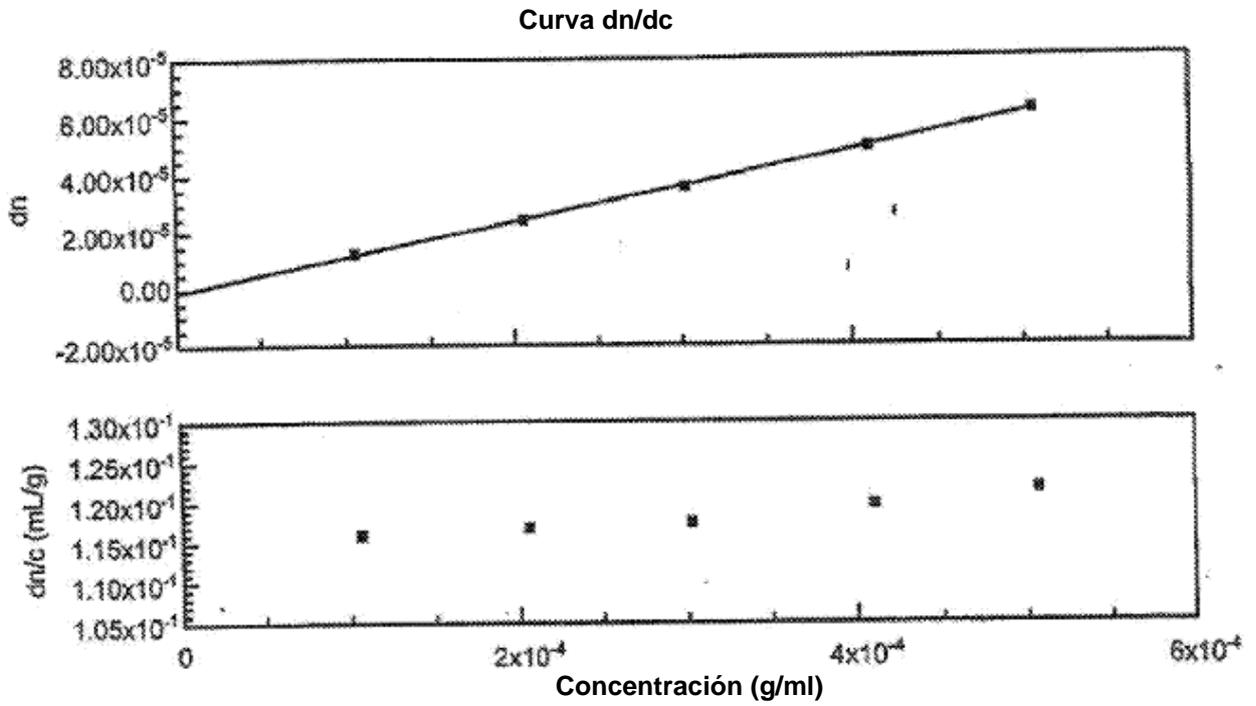


Figura 3b



Número de Estudio	ID de Muestra	Resultados (Daltons)
3098-003	Compuesto G	36.950 [STD 8%]

Figura 4a

Estándar	Tiempo de retención (min)	Peso molecular (g/mol)	LOG (10)
A	8,688	5900	3,77
B	8,326	11800	4,07
C	8,087	22800	4,36
A	7,895	47300	4,87
B	7,614	112000	5,05
C	7,408	212000	5,33

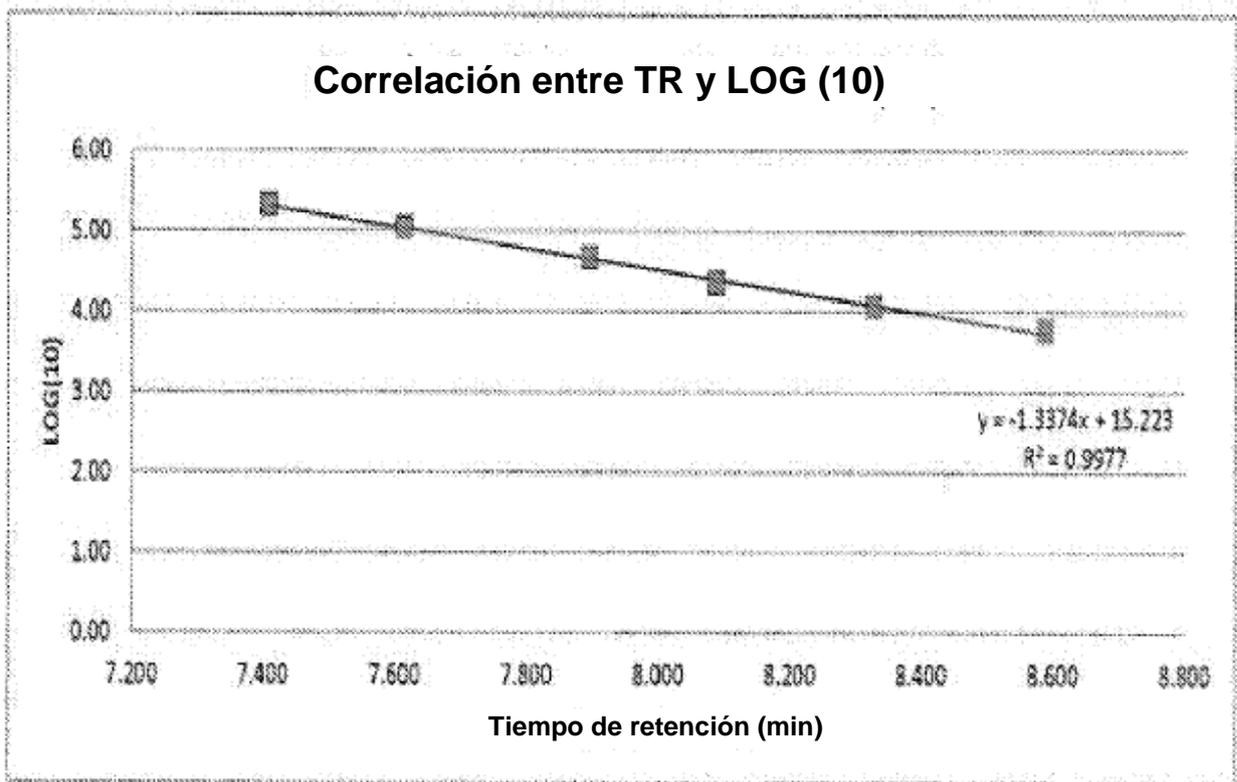
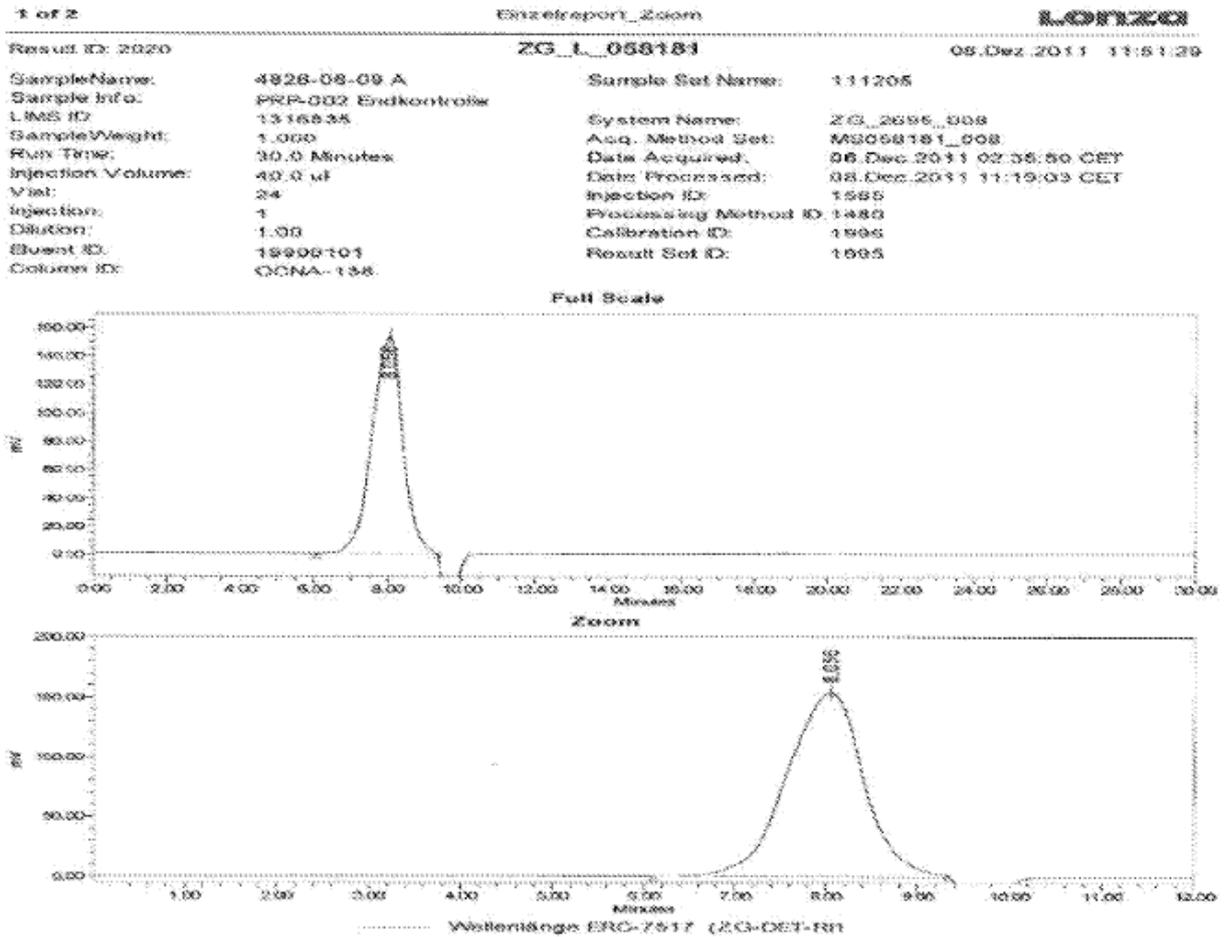


Figura 4b



Resultados:

ID de Muestra	TR	Área	% de área	Intervalo de PM (Daltons)
4828-06-09	8,056	8906130	100%	20 K- 70 K

Figura 5a

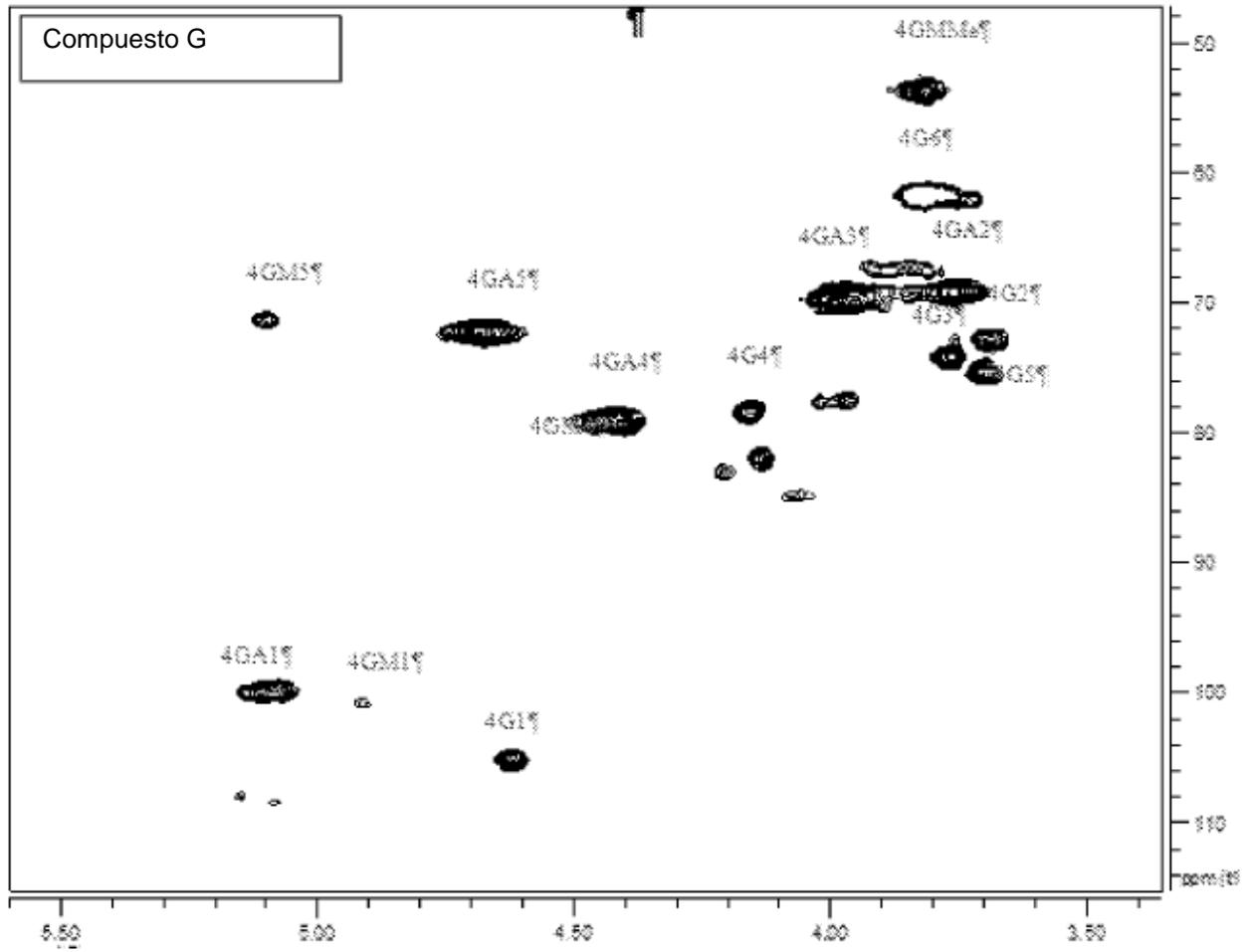


Figura 5b

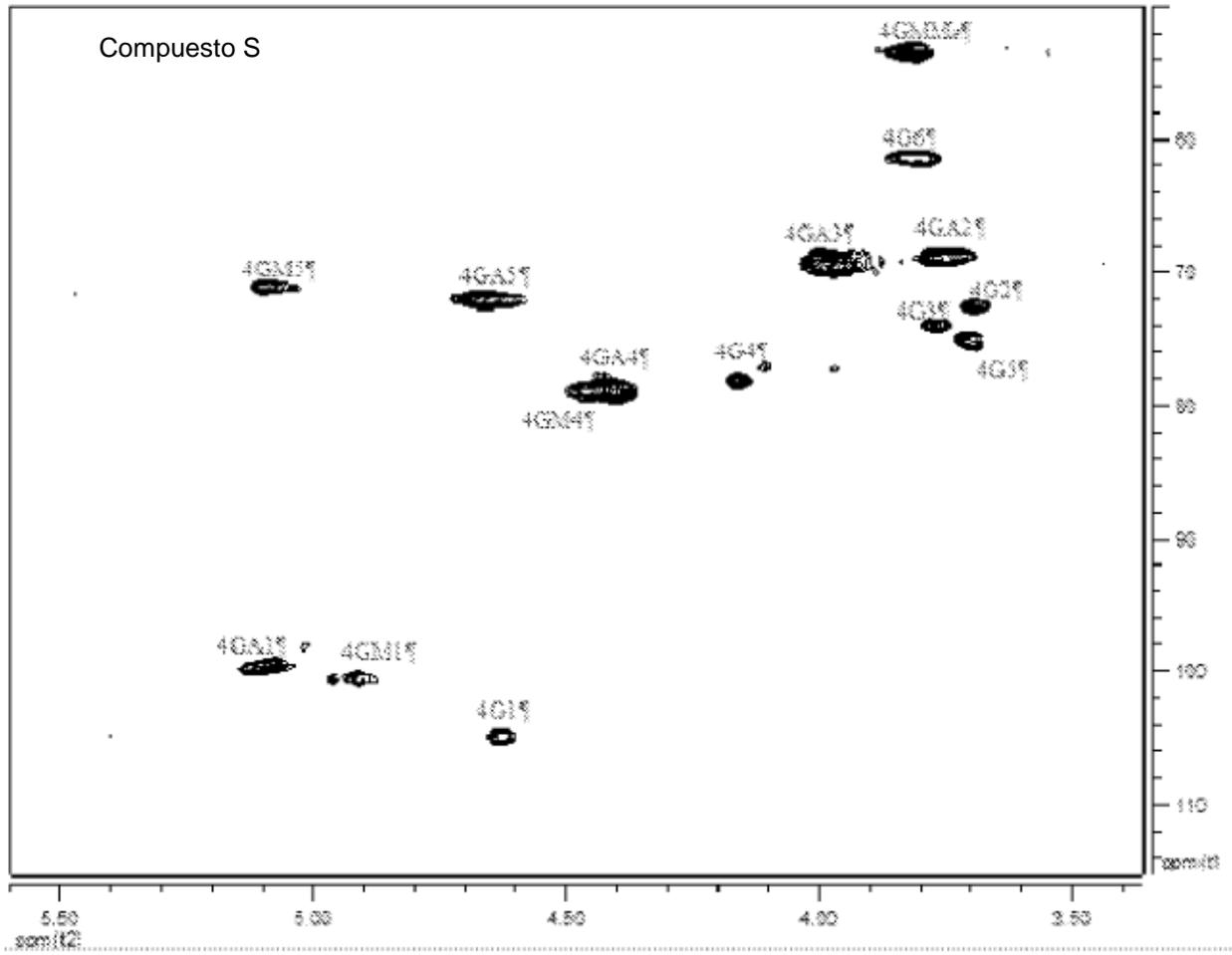


Figura 5c

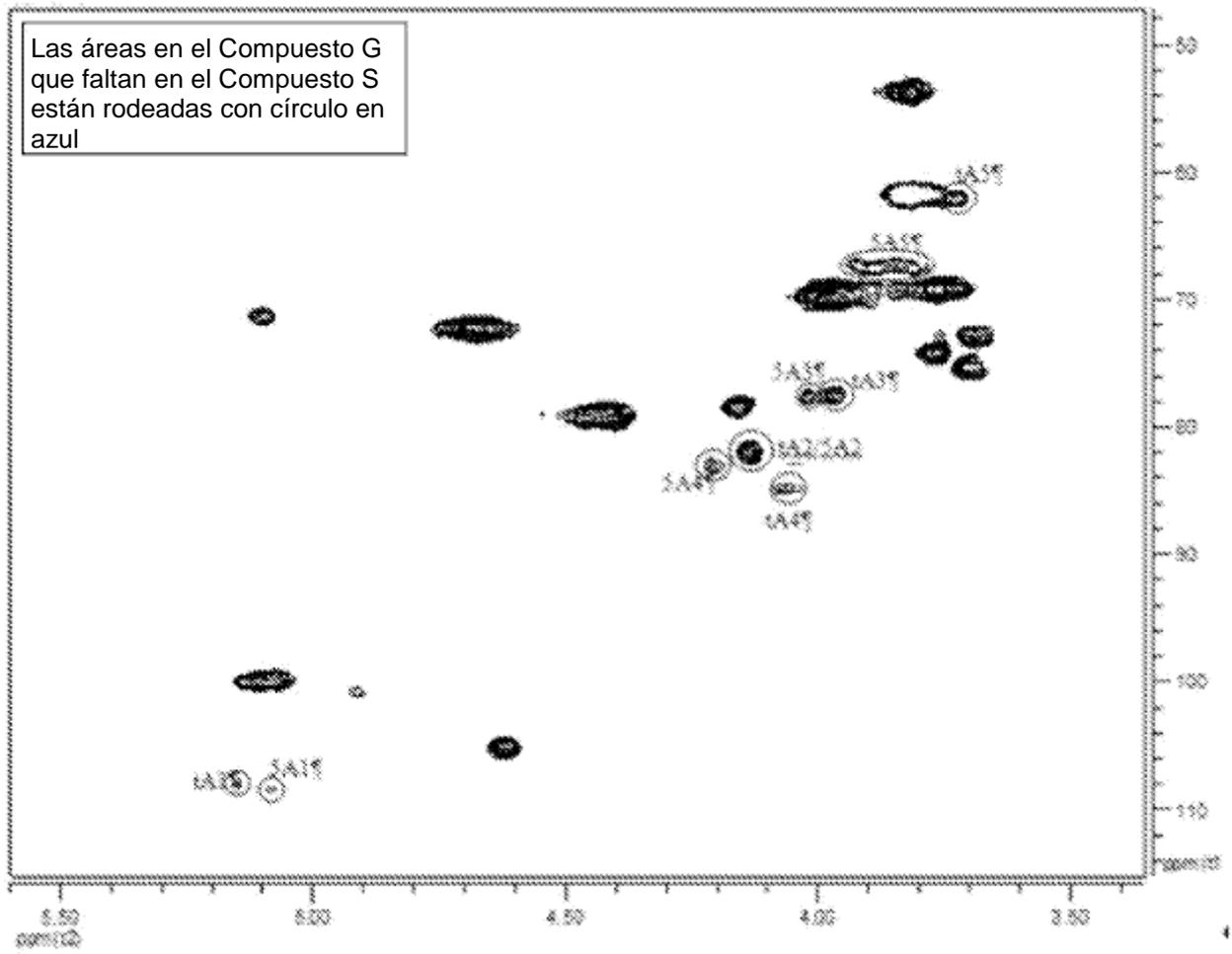


Figura 6a

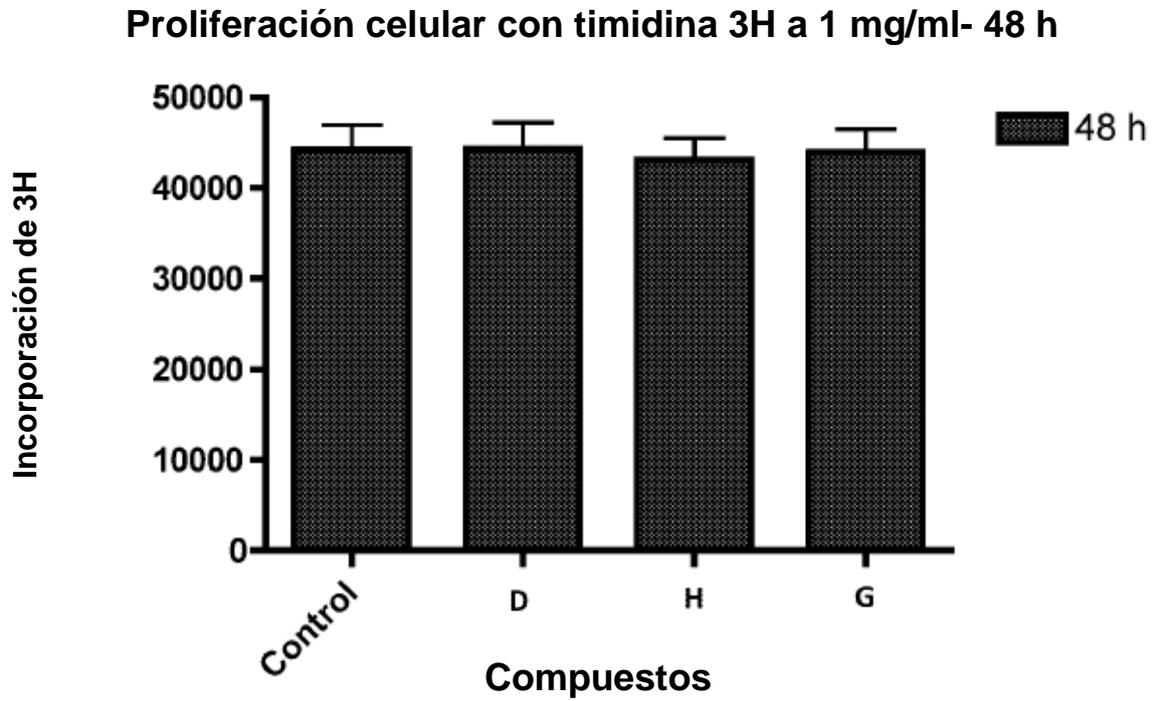


Figura 6b

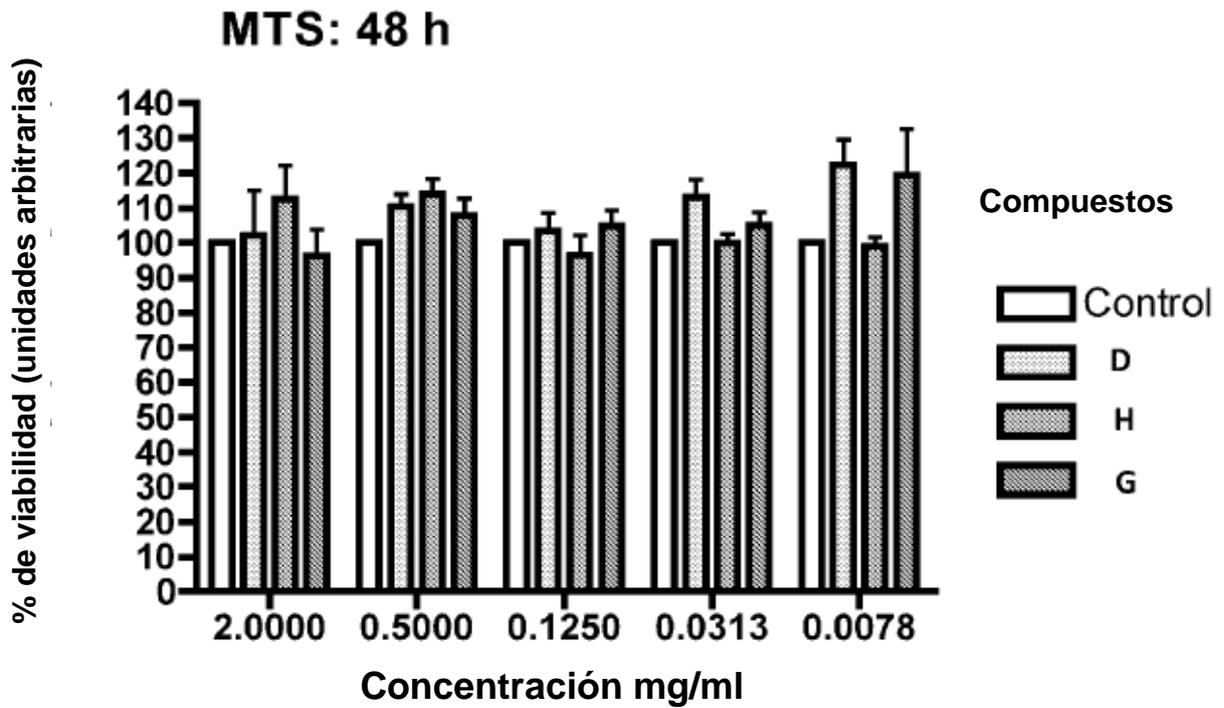


Figura 6c

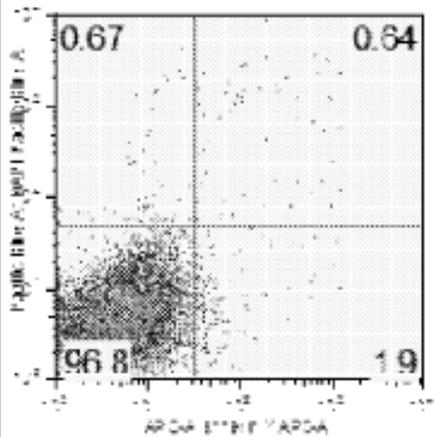
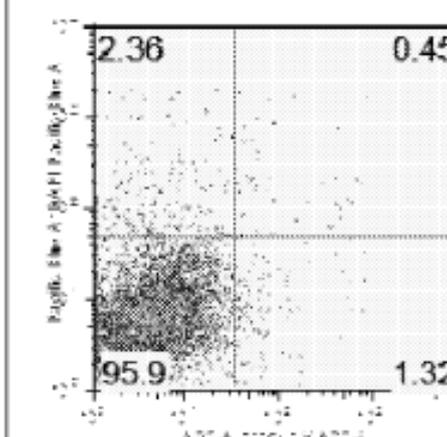
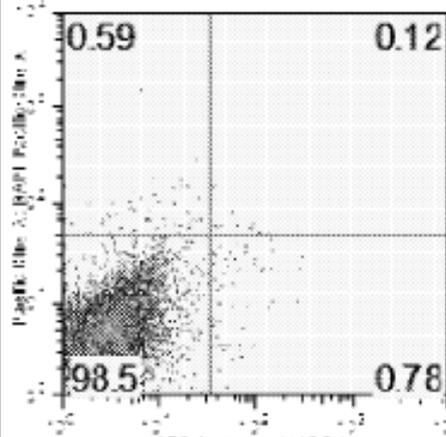
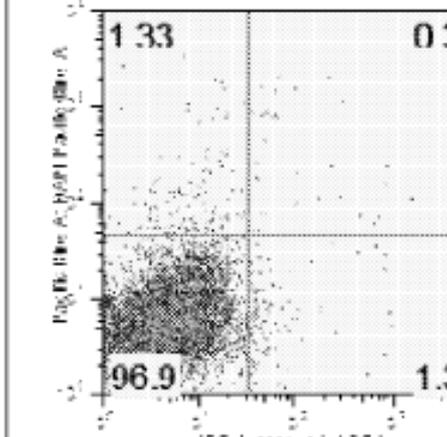
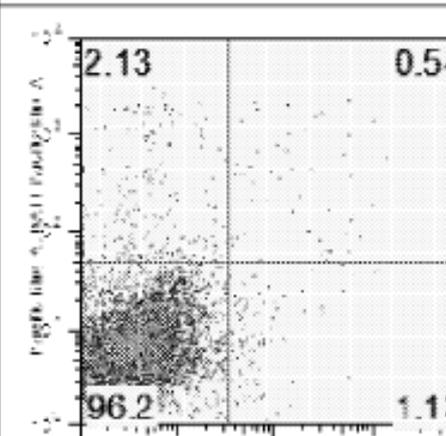
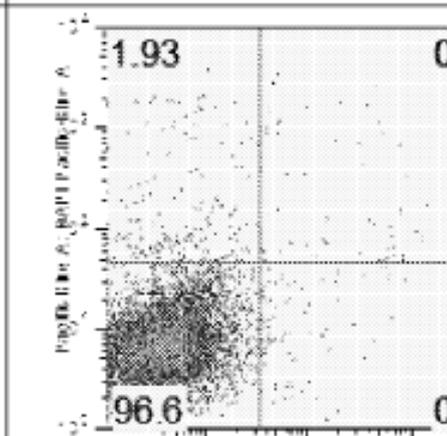
		Análisis de FACS – 0,1 mg/ml	Análisis de FACS – 1 mg/ml
Control del vehículo	Tinción de viabilidad		
	Compuesto G		
	Compuesto D		
		Tinción de apoptosis de Anexina V	Tinción de apoptosis de Anexina V

Figura 6d

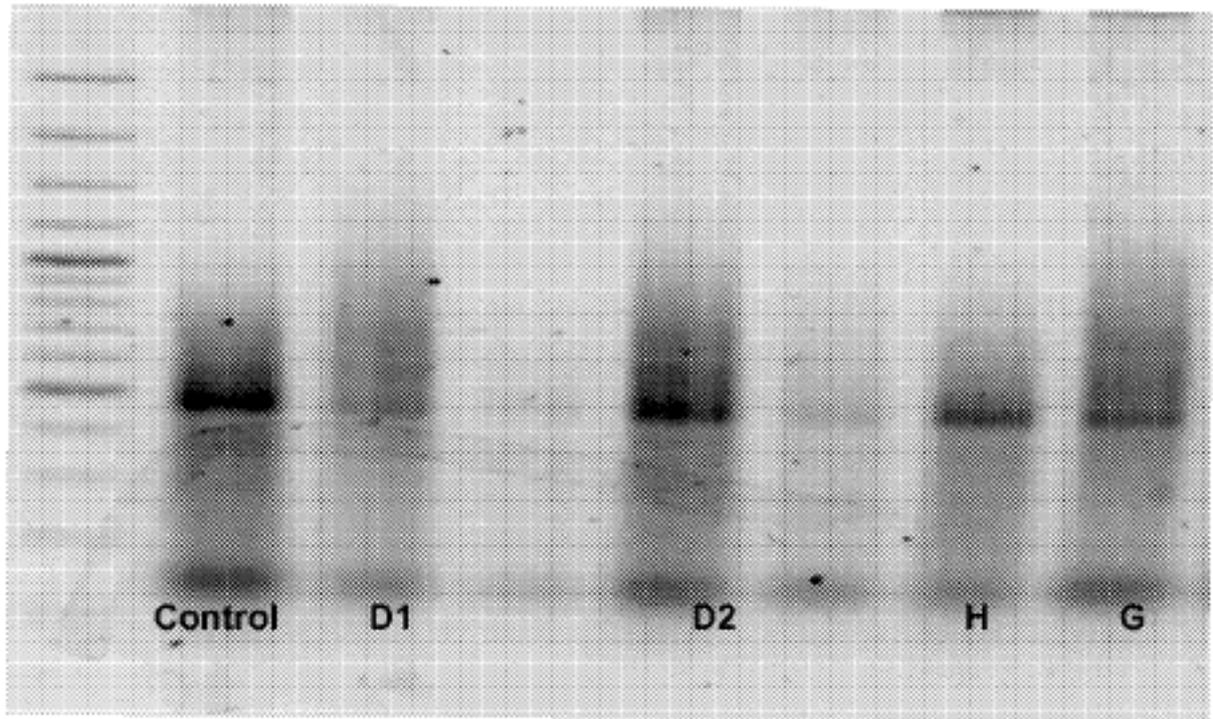


Figura 7

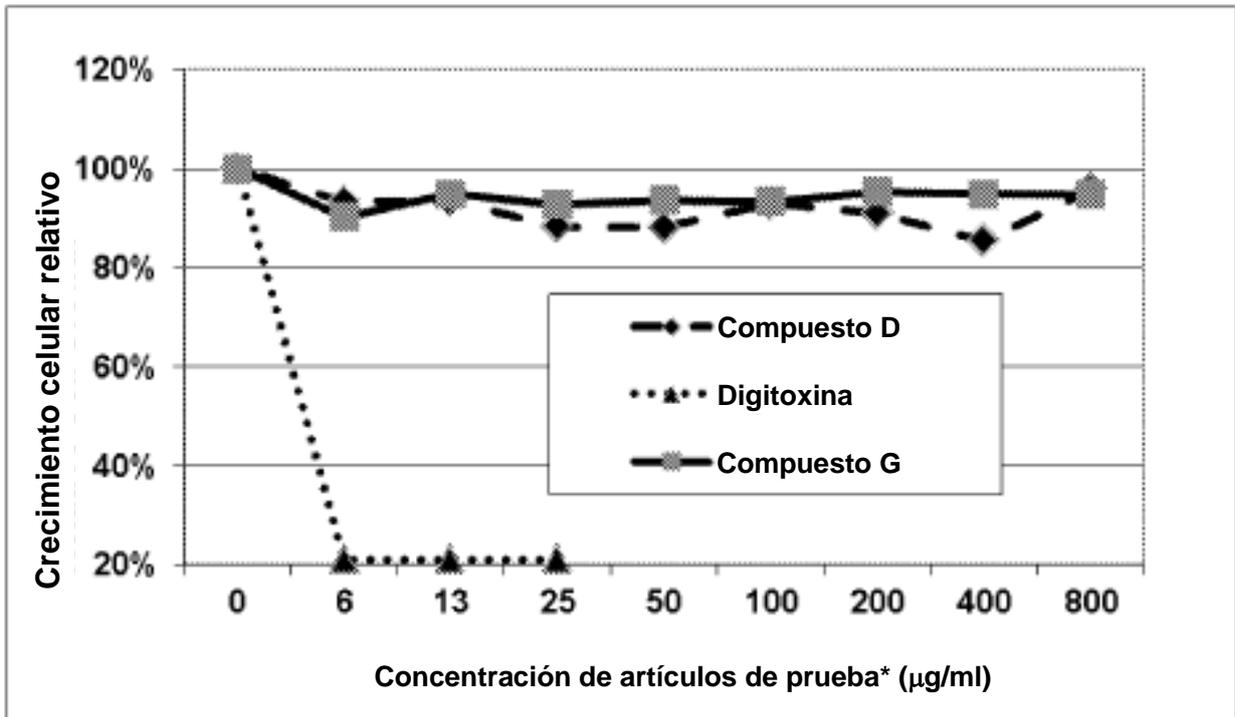


Figura 8

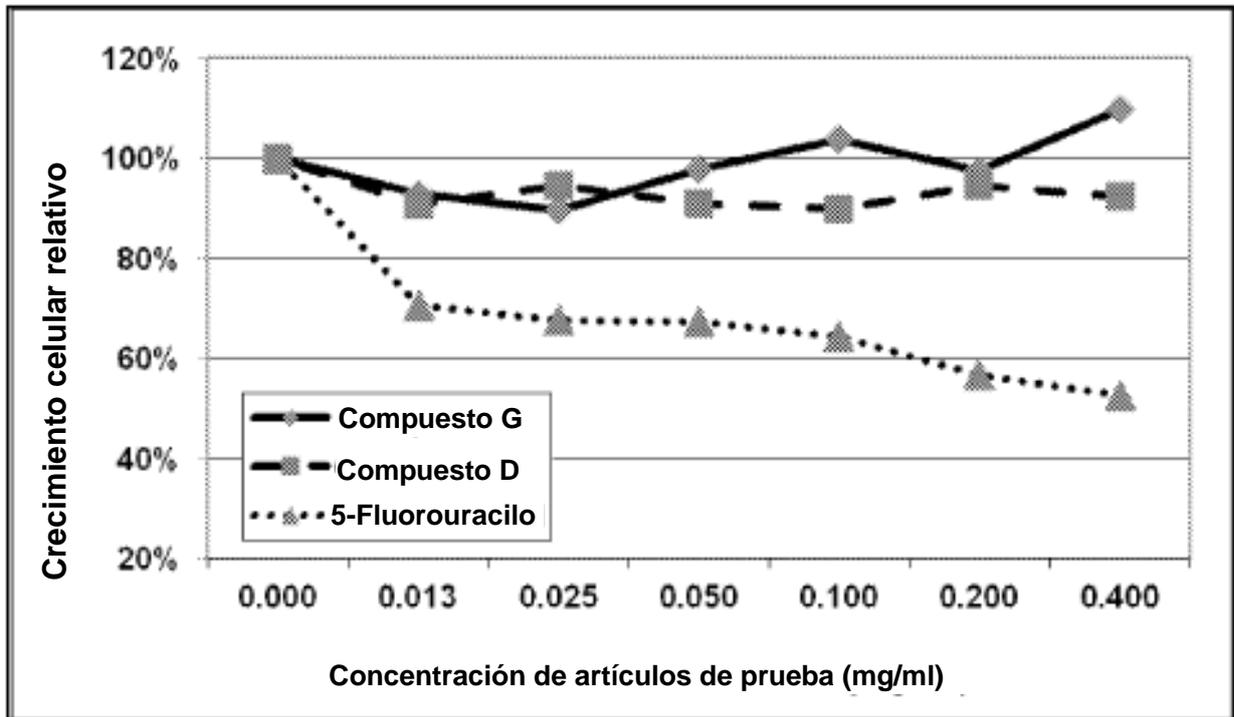


Figura 9

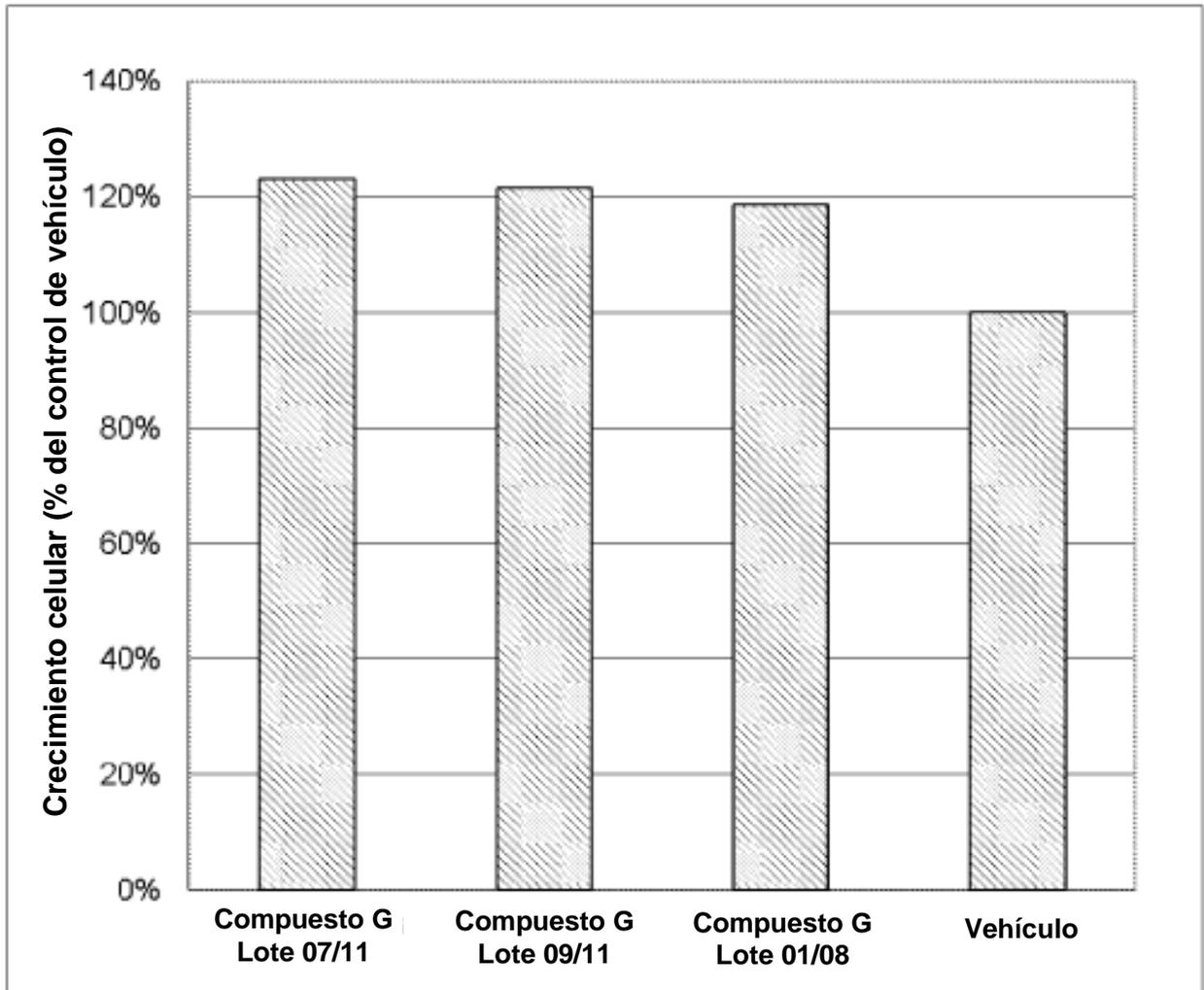


Figura 10

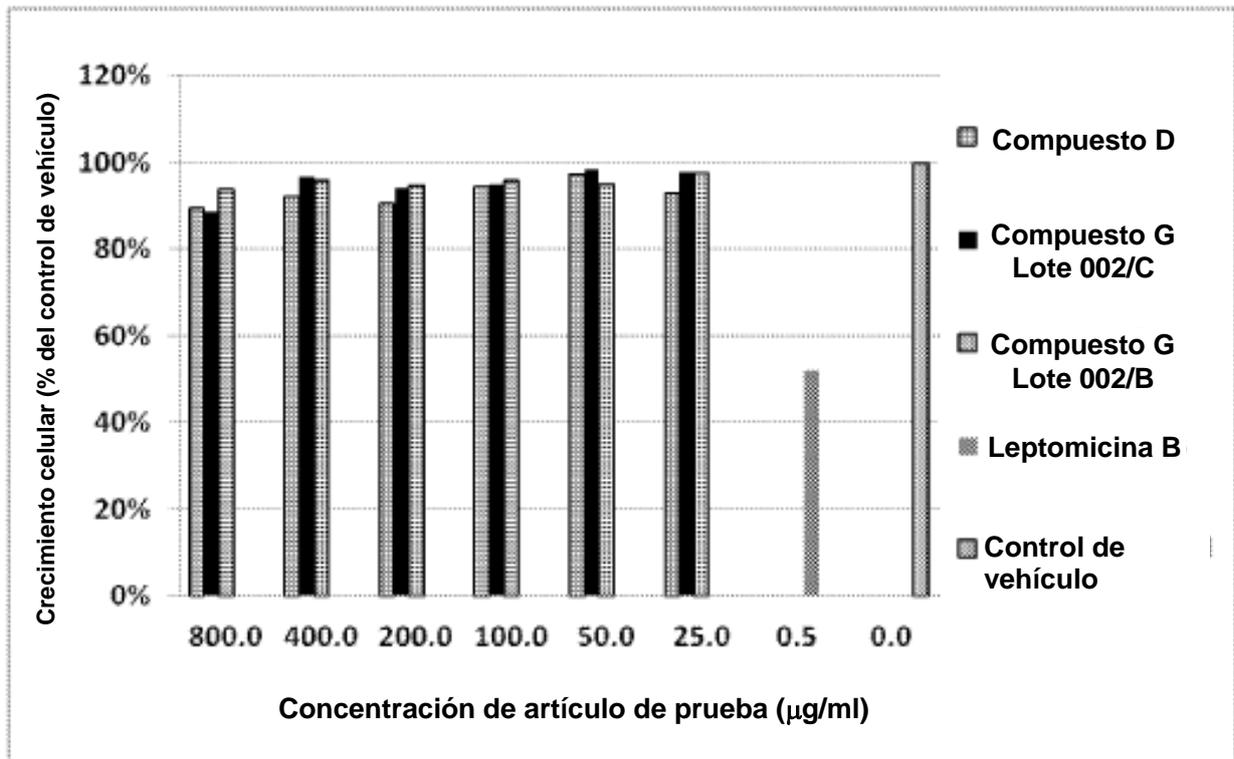


Figura 11

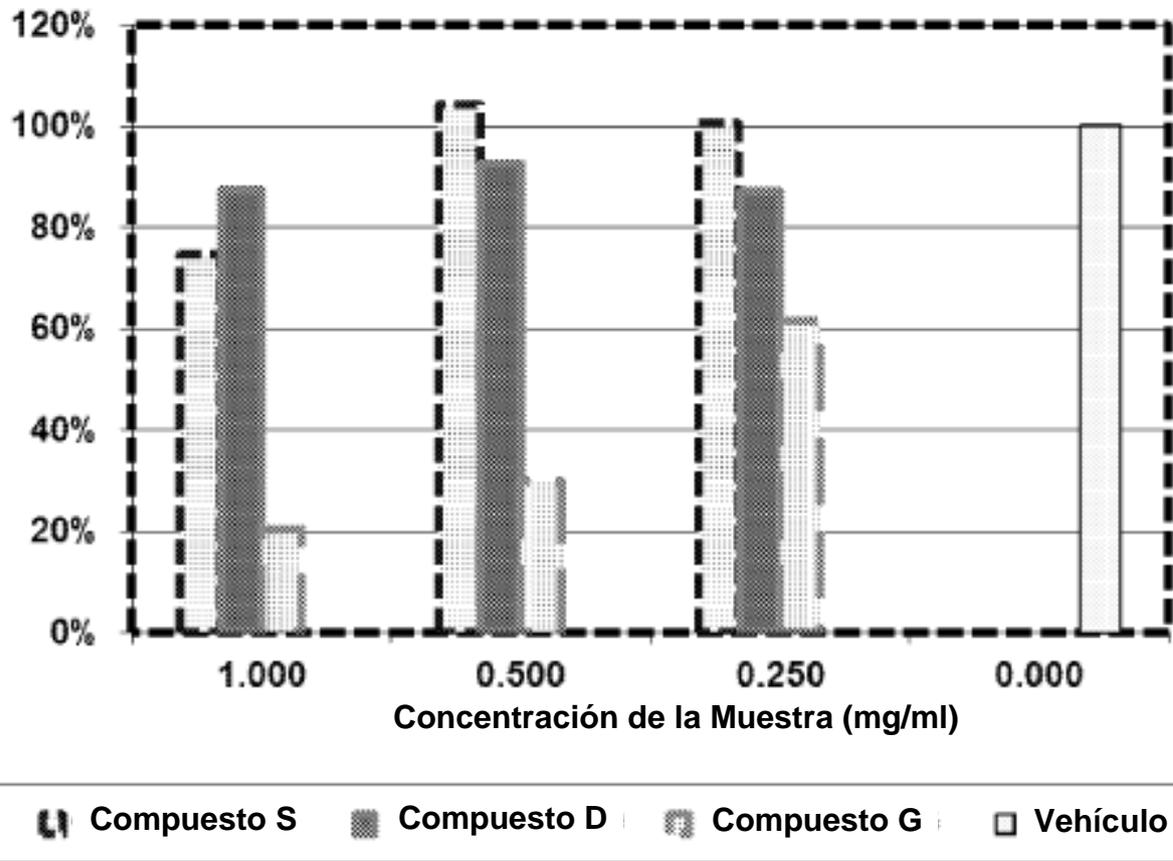


Figura 12

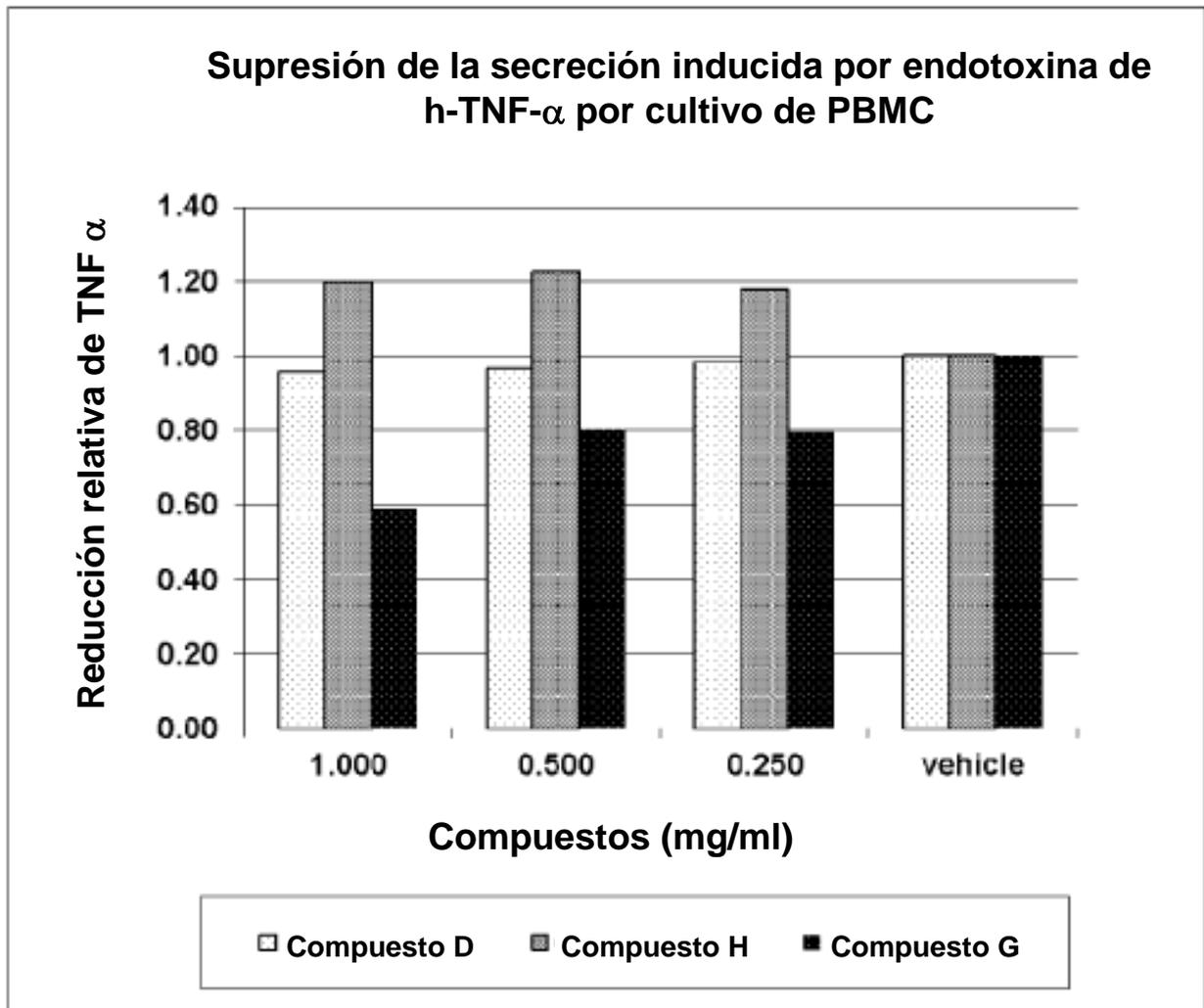


Figura 13

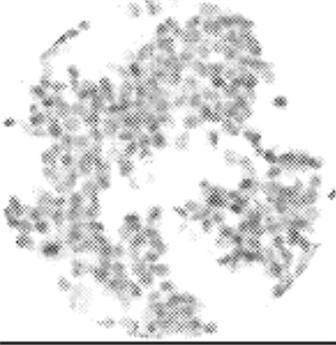
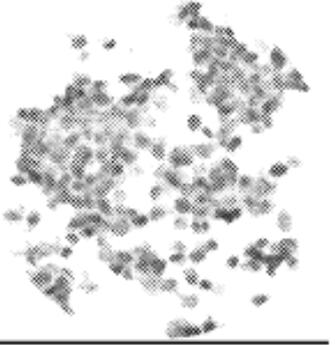
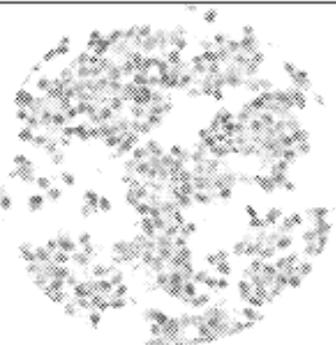
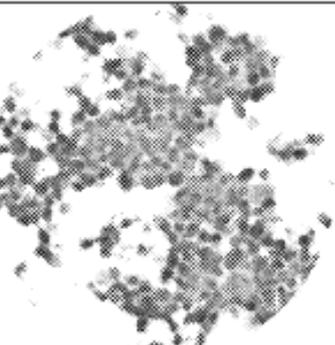
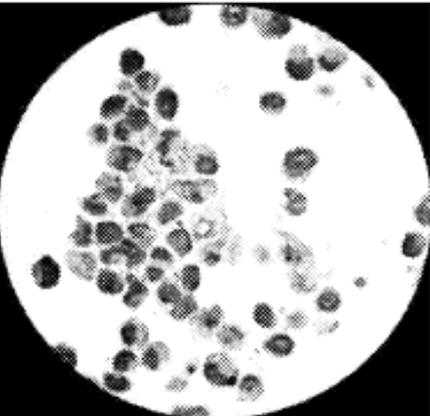
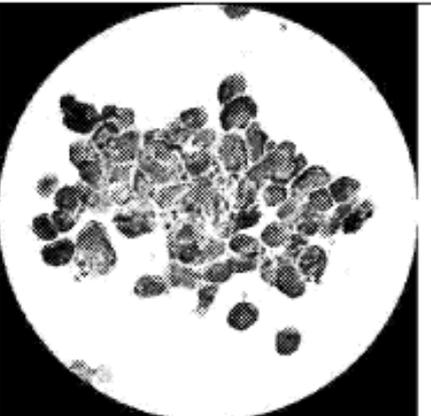
<p><b><u>Primer día de cultivo en medio rico con suero al 2%</u></b></p>	<p><b><u>Primer día de cultivo en medio de estrés con suero al 0,1%</u></b></p>
	
<p><b><u>Después de 6 días de cultivo en medio rico con suero al 2%</u></b></p>	<p><b><u>Después de 6 días de cultivo en medio de estrés con suero al 0,1%</u></b></p>
	
<p><b><u>Cultivo tratado con Compuesto G en medio de estrés con suero al 0,1% durante 6 días</u></b></p>	<p><b><u>Cultivo tratado con Vehículo en medio de estrés con suero al 0,1% durante 6 días</u></b></p>
	

Figura 14

**Fibrosis inducida por tioacetamida en ratas**

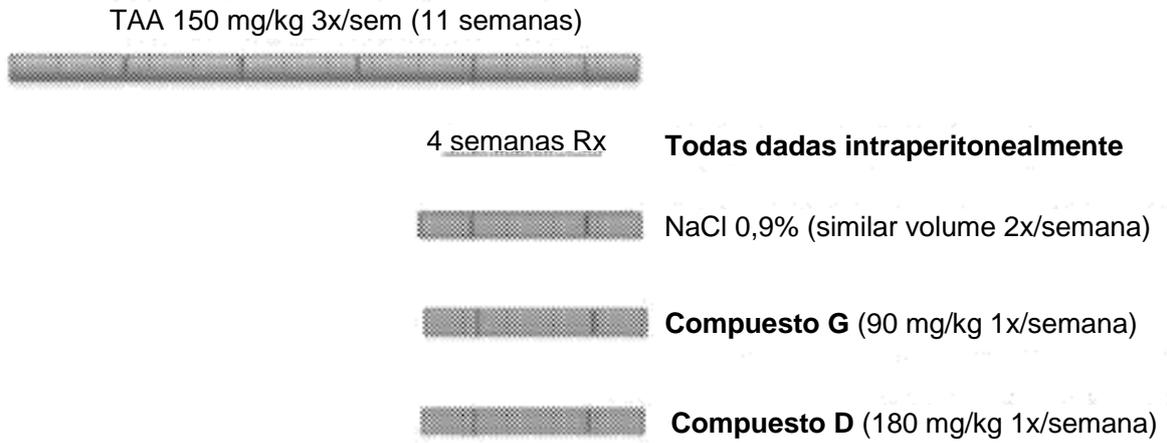


Figura 15

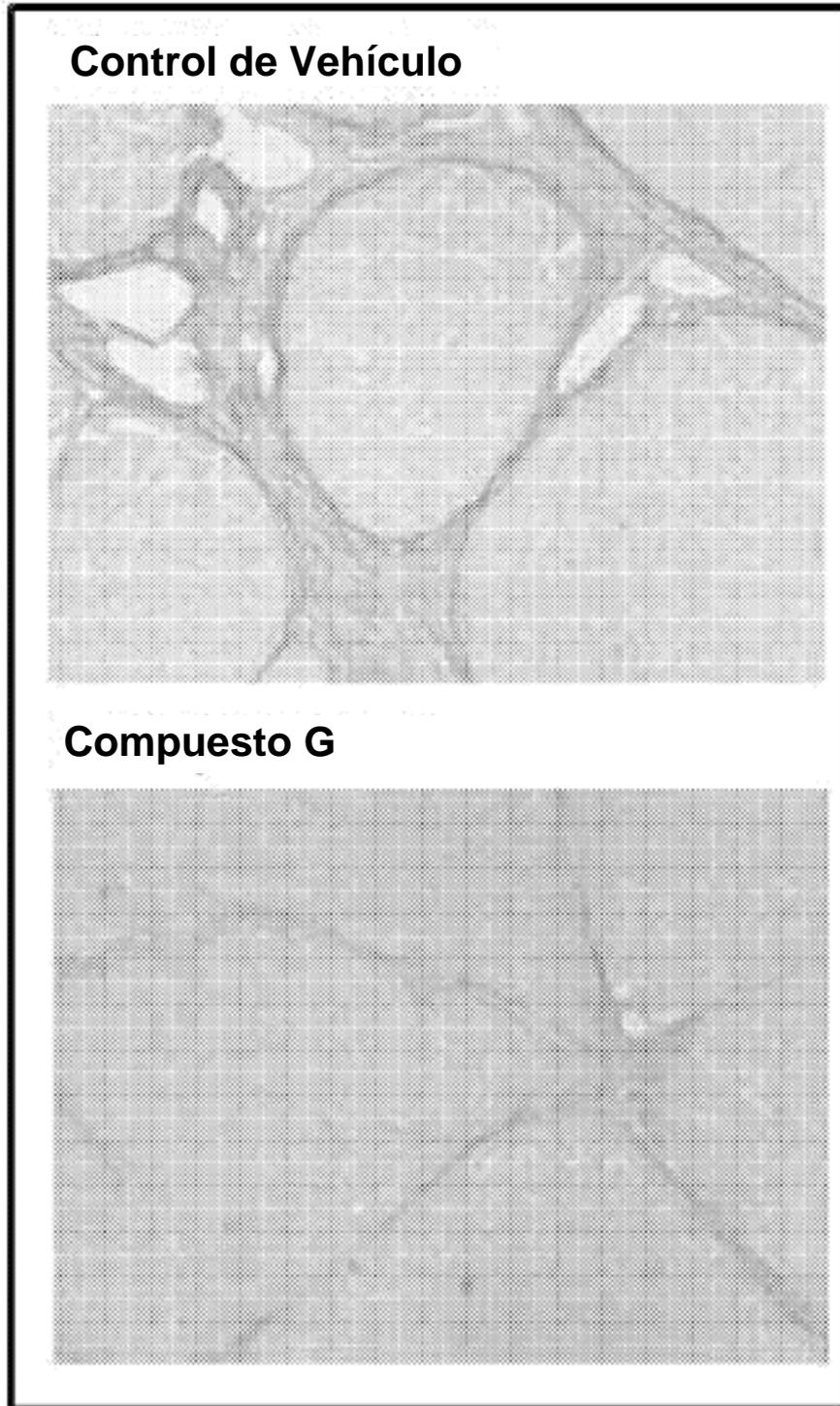


Figura 16

Cuantificación de colágeno en fibrosis hepática

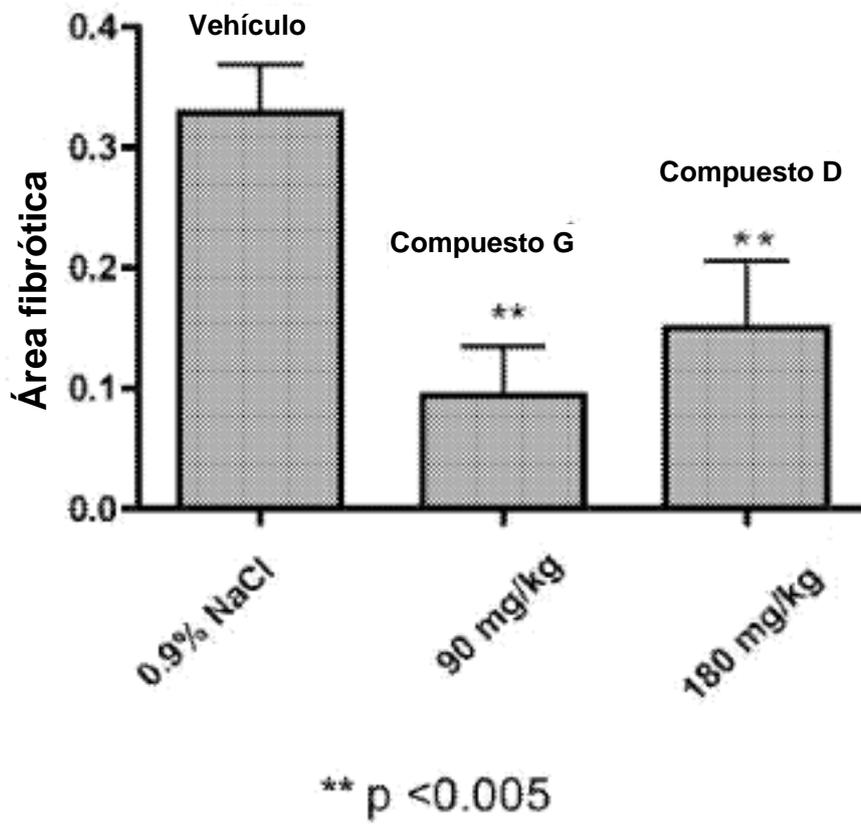


Figura 17

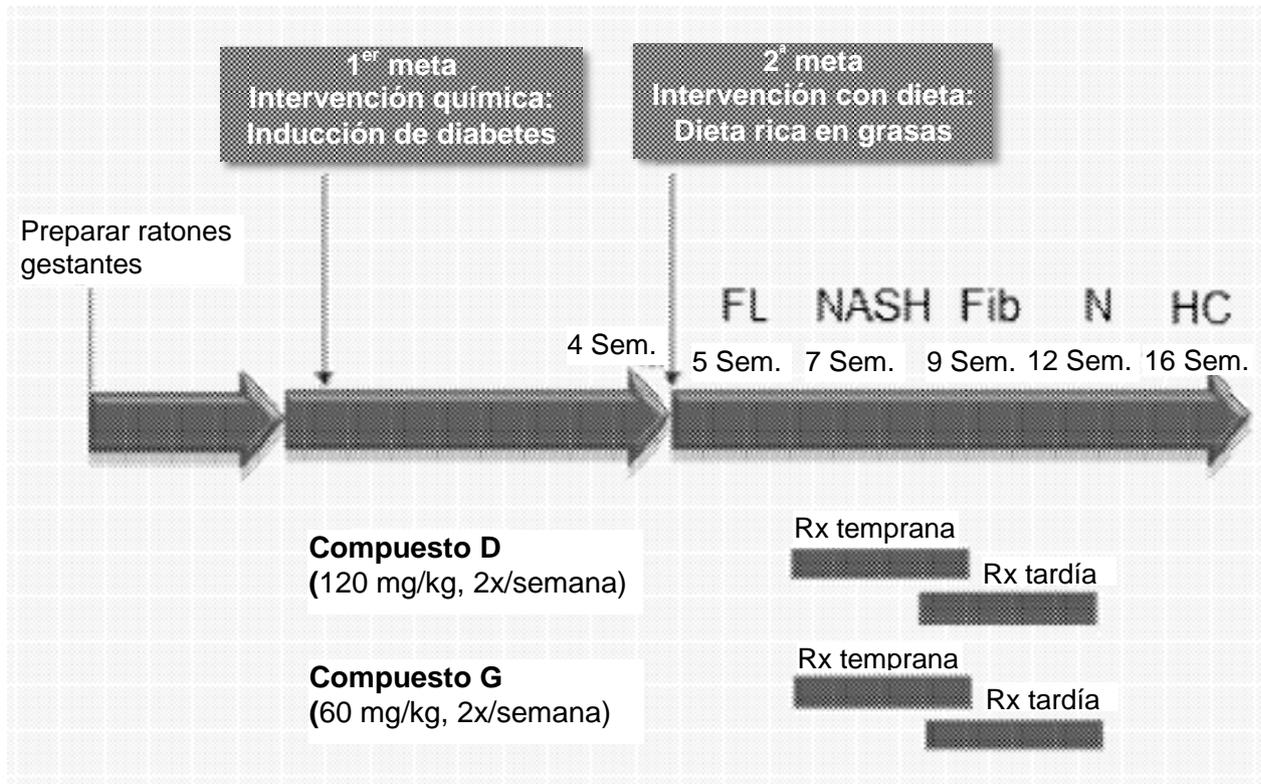


Figura 18

### Peso corporal

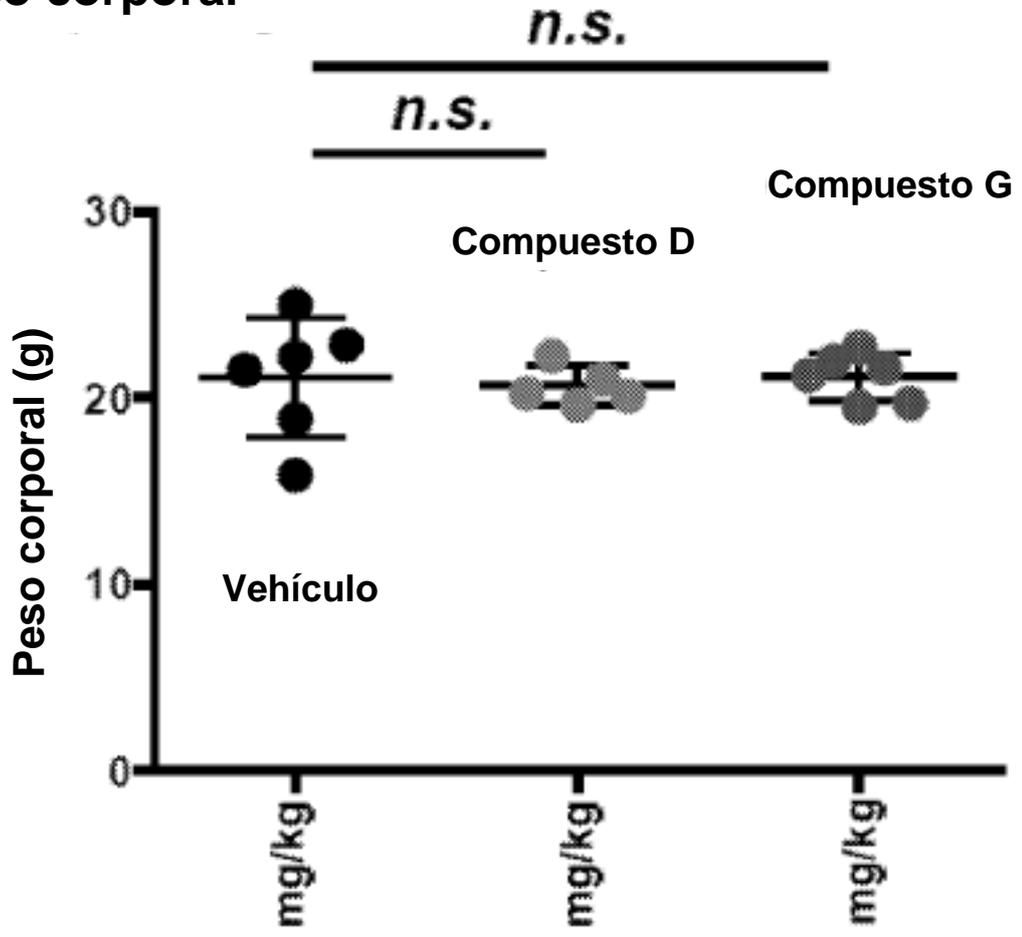


Figura 19

A.

B.

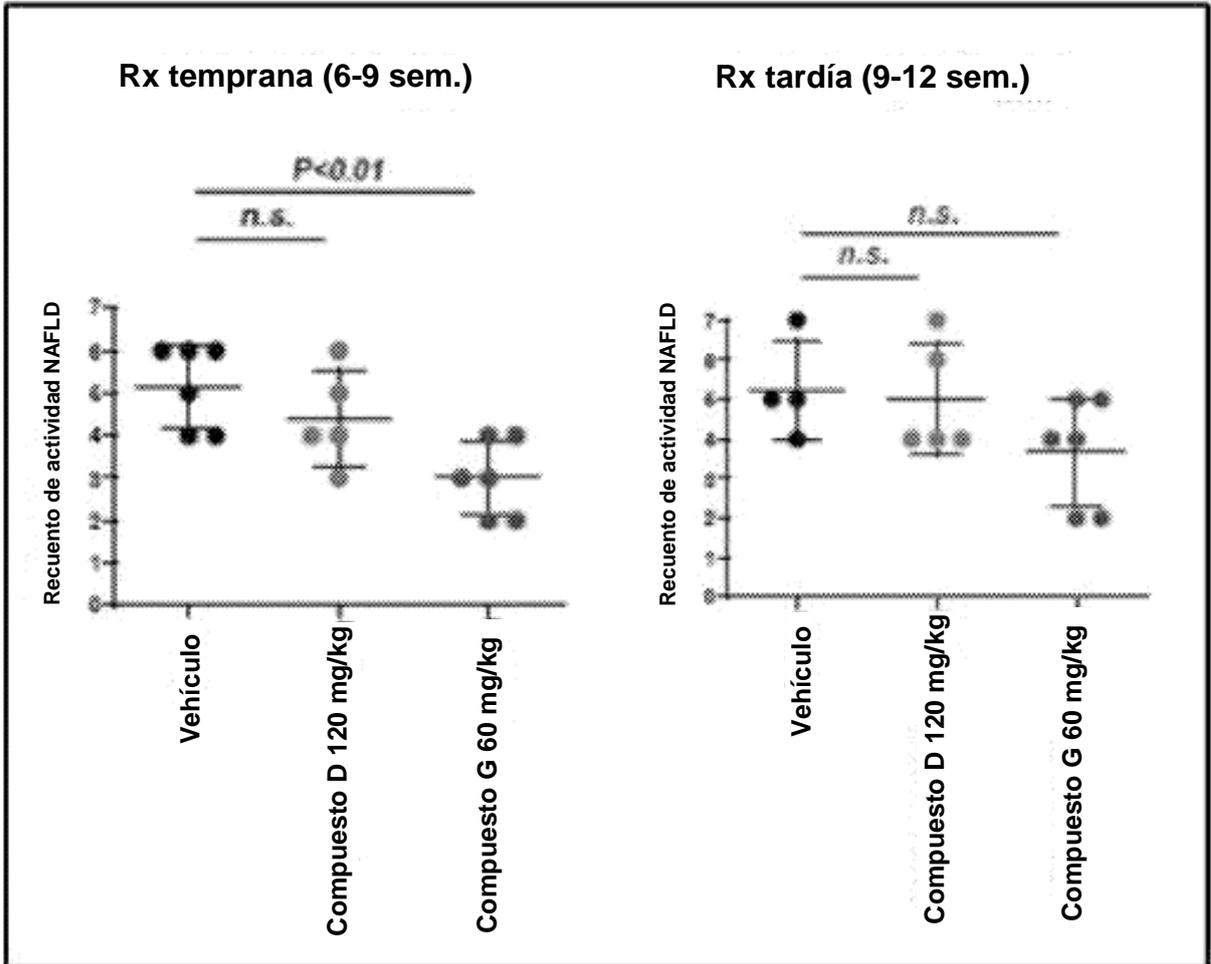


Figura 20

