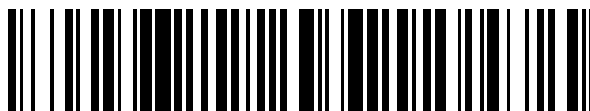


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 976**

51 Int. Cl.:

A61K 31/47 (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014 PCT/EP2014/078779**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15091970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14830806 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3089749**

54 Título: **Preparaciones combinadas para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

19.12.2013 GB 201322626

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

13.11.2019

73 Titular/es:

**IMMUTEP S.A.S. (100.0%)
Parc Club Orsay, 2 rue Jean Rostand
91400 Orsay, FR**

72 Inventor/es:

TRIEBEL, FRÉDÉRIC

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 730 976 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

Preparaciones combinadas para el tratamiento del cáncer

5 Esta invención se refiere a preparaciones combinadas y a composiciones farmacéuticas, y a su uso como medicamentos, en particular para el tratamiento del cáncer.

10 El cáncer puede tratarse con uno o más fármacos antineoplásicos citotóxicos ("agentes quimioterapéuticos") como parte de un régimen normalizado. La quimioterapia puede estar dirigida a curar a un paciente, prolongar la vida o aliviar los síntomas.

15 Los agentes quimioterapéuticos convencionales actúan destruyendo las células que se dividen rápidamente, aprovechando una de las propiedades de la mayoría de las células cancerosas. Sin embargo, la quimioterapia también daña las células que se dividen rápidamente en circunstancias normales, por ejemplo, las células en la médula ósea, el tracto digestivo y los folículos pilosos. Esto causa los efectos secundarios más comunes de la quimioterapia: mielosupresión (disminución de la producción de células sanguíneas, por lo tanto, inmunosupresión), mucositis (inflamación del revestimiento del tracto digestivo) y alopecia (pérdida del cabello).

20 Existe la necesidad de proporcionar tratamientos contra el cáncer más eficaces y de proporcionar tratamientos eficaces contra el cáncer con efectos secundarios reducidos.

25 El gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3) es una proteína de membrana de tipo I homóloga a CD4 con cuatro dominios de la superfamilia de Ig extracelular. Similar a CD4, LAG-3 oligomeriza en las superficies de linfocitos T y se une a moléculas MHC de clase II en células presentadoras de antígeno (APC) pero con afinidad significativamente mayor que CD4. LAG-3 se expresa en linfocitos T CD4 positivos y CD8 positivos activados donde se asocia con el complejo CD3-TCR en la superficie celular y regula negativamente la transducción de señales. Como consecuencia, regula negativamente la proliferación de linfocitos T, la función y la homeostasis.

30 Se ha demostrado que las proteínas de fusión solubles derivadas de LAG-3 se unen a las moléculas MHC de clase II con una avidéz mucho mayor que la de CD4, para aumentar la capacidad de los macrófagos MHC de clase II positivos y las células dendríticas inmaduras para inducir respuestas de linfocitos T *in vitro*, y para potenciar la inducción *in vitro* de linfocitos T citotóxicos víricos y específicos de tumores. En consecuencia, una proteína de fusión LAG-3 se utiliza como un inmunoestimulante sistémico y como adyuvante para vacunas contra el cáncer.

35 El documento WO 2009/044273 describe el uso de la proteína LAG-3 recombinante, o sus derivados, para estimular una respuesta inmunitaria mediada por monocitos, en particular para inducir un aumento en el número de monocitos en sangre, para el tratamiento del cáncer.

40 Actualmente se ha encontrado sorprendentemente que la administración de la proteína LAG-3, o un derivado de la misma que es capaz de unirse a moléculas MHC de clase II, y un agente antineoplásico basado en platino, o un inhibidor de topoisomerasa I, tiene un efecto sinérgico en la reducción del crecimiento del tumor.

45 De acuerdo con la invención, se proporciona una preparación combinada, que comprende: (a) proteína LAG-3, o un derivado de la misma que es capaz de unirse a moléculas MHC de clase II; y (b) un agente antineoplásico, donde el agente antineoplásico es un agente antineoplásico basado en platino o un inhibidor de topoisomerasa I.

50 La expresión "preparación combinada", como se usa en el presente documento, se refiere a un "kit de partes" en el sentido de que los componentes (a) y (b) de la combinación como se definen anteriormente pueden dosificarse independientemente o mediante el uso de combinaciones fijas diferentes con cantidades distinguidas de los componentes (a) y (b) de la combinación. Los componentes pueden administrarse simultáneamente o uno después del otro. Si los componentes se administran uno después del otro, se elige preferentemente el intervalo de tiempo entre la administración de modo que el efecto terapéutico del uso combinado de los componentes sea mayor que el efecto que se obtendría mediante el uso de únicamente uno cualquiera de los componentes (a) y (b) de la combinación.

55 Los componentes de la preparación combinada pueden estar presentes en una forma de dosificación unitaria combinada, o como una primera forma de dosificación unitaria del componente (a) y una segunda forma de dosificación unitaria separada del componente (b). La relación de las cantidades totales del componente (a) de la combinación al componente (b) de la combinación a administrar en la preparación combinada puede variarse, por ejemplo, para afrontar las necesidades de una subpoblación de pacientes a tratar, o las necesidades del paciente individual, que pueden deberse, por ejemplo, a la enfermedad particular, la edad, el género o el peso corporal del paciente.

65 Preferentemente, hay al menos un efecto beneficioso, por ejemplo, una potenciación del efecto del agente antineoplásico o una potenciación mutua del efecto de los componentes de combinación (a) y (b), por ejemplo, un efecto más que aditivo, efectos ventajosos adicionales, menos efectos secundarios, menos toxicidad o un efecto

terapéutico combinado en comparación con una dosificación eficaz de uno o ambos componentes (a) y (b) de la combinación, y muy preferentemente sinergia de los componentes (a) y (b) de la combinación.

Una preparación combinada de la invención puede proporcionarse como una preparación combinada farmacéutica para la administración a un mamífero, preferentemente un ser humano. La proteína LAG-3, o derivado de la misma, puede proporcionarse opcionalmente junto con un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o el agente antineoplásico puede proporcionarse opcionalmente junto con un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La LAG-3, o derivado de la misma, puede estar presente a una dosis que es un equivalente molar de 0,25-30 mg, 1-30 mg o 6-30 mg de la proteína de fusión LAG-3Ig derivada de LAG-3 IMP321. Las dosis de 6-30 mg por inyección subcutánea (s.c.) de IMP321 han demostrado ser seguras y proporcionar una exposición sistémica aceptable basándose en los resultados de los datos farmacocinéticos obtenidos en pacientes con cáncer metastásico de células renales. Se obtiene una concentración en sangre de IMP321 superior a 1 ng/ml durante al menos 24 horas después de la inyección s.c. en pacientes a los que se ha inyectado dosis de IMP321 de más de 6 mg.

Una preparación combinada de la invención puede comprender una pluralidad de dosis de la proteína LAG-3, o derivado de la misma.

La dosis del agente antineoplásico dependerá del agente antineoplásico particular que se utilice.

Los agentes antineoplásicos basados en platino son complejos de coordinación de platino utilizados en la quimioterapia contra el cáncer. Se cree que forman entrecruzamientos en el ADN que inhiben la reparación del ADN y/o la síntesis de ADN dando como resultado la muerte celular. El principal efecto secundario limitante de la dosis del tratamiento del cáncer utilizando compuestos de platino es la neurotoxicidad periférica. Los ejemplos de agentes antineoplásicos basados en platino incluyen cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, Nedaplatino y Triplatinato.

El carboplatino o *cis*-diamina (ciclobutano-1,1-dicarboxilato-*O,O'*) de platino (II) (nombres comerciales Paraplatino y Paraplatino-AQ), se usa contra algunas formas de cáncer (principalmente carcinoma de ovario, pulmón, cánceres de cabeza y cuello así como de endometrio, de esófago, de vejiga, de mama y cervical; tumores de células germinales o del sistema nervioso central; sarcoma osteogénico, y como preparación para un trasplante de células madre o médula ósea). Tiene efectos secundarios muy reducidos en comparación con su compuesto precursor cisplatino. Las pautas para la dosificación de carboplatino están disponibles en la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA).

El oxaliplatino, o [(1R, 2R) -ciclohexano-1,2-diamina] (etanodioato-*O,O'*) de platino (II) (nombre comercial Eloxatin), comprende un centro cuadrado planar de platino (II). A diferencia de cisplatino y carboplatino, oxaliplatino comprende el ligando bidentado 1,2-diaminociclohexano en lugar de los dos ligandos de amina monodentados. También tiene un grupo oxalato bidentado. El oxaliplatino tiene actividad antitumoral contra el carcinoma de colon. El oxaliplatino funciona mediante la formación de entrecruzamientos dentro de las cadenas y entre cadenas en el ADN. Los entrecruzamientos en el ADN evitan la replicación y transcripción del ADN, dando como resultado la muerte celular. La dosis recomendada de oxaliplatino en un entorno adyuvante es de 85 mg/m² por vía intravenosa repetida cada dos semanas durante 12 ciclos. Una dosis recomendada para oxaliplatino en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico es de 85 mg/m² por vía intravenosa repetida cada dos semanas hasta la progresión de la enfermedad o una toxicidad inaceptable.

Los inhibidores de la topoisomerasa son agentes diseñados para interferir con la acción de las enzimas topoisomerasas (topoisomerasa I y II), que son enzimas que controlan los cambios en la estructura del ADN al catalizar la ruptura y la unión de la estructura fosfodiéster de las cadenas de ADN durante el ciclo celular normal. Se cree que los inhibidores de la topoisomerasa bloquean la etapa de unión del ciclo celular, generando rupturas de cadena simple y doble que dañan la integridad del genoma. La introducción de estas rupturas conduce posteriormente a la apoptosis y la muerte celular.

La topoisomerasa I del ADN humana (Top1) es una enzima esencial que relaja el superenrollamiento del ADN durante la replicación y la transcripción. Top1 genera rupturas de cadena sencilla de ADN que permiten la rotación de la cadena escindida alrededor del eje de LA doble hélice. Top1 también vuelve a unir la cadena escindida para restablecer el ADN de doble cadena intacto. Los intermedios Top1-ADN, conocidos como complejos de escisión, son transitorios y se encuentran en niveles bajos en circunstancias normales. Sin embargo, el tratamiento con inhibidores de Top1, tal como las camptotecinas, estabiliza los complejos de escisión, evita la unión de nuevo del ADN e induce rupturas letales de la cadena de ADN. Las células cancerosas son selectivamente sensibles a la generación de estas lesiones de ADN.

El topotecán o monohidrato de (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroxi-1H-pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-fc]quinolin-3,14-(4H,12H)-diona (nombre comercial Hycamtin), es un agente quimioterapéutico que es un inhibidor de la topoisomerasa I. Es un derivado soluble en agua de la camptotecina. Se utiliza en forma de clorhidrato para tratar el cáncer de ovario y el cáncer de pulmón, así como otros tipos de cáncer. Topotecán es un derivado semisintético

de la camptotecina. La camptotecina es un producto natural extraído de la corteza del árbol *Camptotheca acuminata*. La topoisomerasa-I es una enzima nuclear que alivia la tensión torsional en el ADN al abrir rupturas de una sola cadena. Una vez que la topoisomerasa-I crea una ruptura de una sola cadena, el ADN puede rotar frente a la horquilla de replicación que avanza. El topotecán se intercala entre las bases de ADN. Esta intercalación interrumpe la maquinaria de duplicación del ADN cuando alcanza un sitio donde está intercalado topotecán. Esta interrupción evita la replicación del ADN y, en última instancia, conduce a la muerte celular. Las células de mamíferos no pueden reparar eficazmente estas rupturas de doble cadena. Este proceso conduce a rupturas en la cadena de ADN que da como resultado la apoptosis.

Una dosis recomendada de cápsulas de Hycamtin es de 2,3 mg/m² de superficie corporal/día administrada durante cinco días consecutivos con un intervalo de tres semanas entre el inicio de cada curso.

Otro derivado de la camptotecina, el irinotecán (CPT11), está aprobado para el tratamiento del cáncer de colon.

Una preparación combinada de la invención puede comprender una pluralidad de dosis del agente antineoplásico.

La proteína LAG-3 puede ser una proteína LAG-3 natural o recombinante aislada. La proteína LAG-3 puede comprender una secuencia amino de la proteína LAG-3 de cualquier especie adecuada, tal como una proteína LAG-3 de primate o murina, pero preferentemente una proteína LAG-3 humana. La secuencia de aminoácidos de la proteína LAG-3 humana y murina se proporciona en la figura 1 de Huard et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 11: 5744-5749, 1997). La secuencia de la proteína LAG-3 humana se repite en la Figura 13 a continuación (SEQ ID NO: 1). Las secuencias de aminoácidos de los cuatro dominios de la superfamilia de Ig extracelulares (D1, D2, D3 y D4) de LAG-3 humana también se identifican en la Figura 1 de Huard et al., en los restos de aminoácido: 1-149 (D1); 150-239 (D2); 240-330 (D3); y 331-412 (D4).

Los derivados de la proteína LAG-3 incluyen fragmentos, variantes o mutantes de la proteína LAG-3 que pueden unirse a moléculas MHC de clase II. Se conocen varios derivados de la proteína LAG-3 que pueden unirse a moléculas MHC de clase II. Muchos ejemplos de dichos derivados se describen en Huard et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 11: 5744-5749, 1997). Este documento describe la caracterización del sitio de unión de MHC de clase II en la proteína LAG-3. Se describen métodos para generar mutantes de LAG-3, así como un ensayo de adhesión celular cuantitativo para determinar la capacidad de los mutantes de LAG-3 de unirse a células Daudi positivas para clase II. Se determinó la unión de varios mutantes diferentes de LAG-3 a moléculas MHC de clase II. Algunas mutaciones pueden reducir la unión de clase II, mientras que otras mutaciones aumentaban la afinidad de LAG-3 por moléculas de clase II. Muchos de los restos esenciales para la unión de proteínas MHC de clase II están agrupados en la base de una estructura grande de bucle adicional de 30 aminoácidos en el dominio D1 de LAG-3. La secuencia de aminoácidos de la estructura de bucle adicional del dominio D1 de la proteína LAG-3 humana es GPPAAAPGHPAPGHPAAPPSSWGPRPRRY (SEQ ID NO: 2), la secuencia subrayada en la Figura 13.

El derivado de la proteína LAG-3 puede comprender la secuencia de bucle adicional de 30 aminoácidos del dominio D1 de LAG-3 humana, o una variante de dicha secuencia con una o más sustituciones de aminoácido conservativas. La variante puede comprender la secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de identidad de aminoácidos con la secuencia de bucle adicional de 30 aminoácidos del dominio D1 de LAG-3 humana.

El derivado de la proteína LAG-3 puede comprender una secuencia de aminoácidos del dominio D1, y opcionalmente el dominio D2, de la proteína LAG-3, preferentemente la proteína LAG-3 humana.

El derivado de la proteína LAG-3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de identidad de aminoácidos con el dominio D1, o con el dominio D1 y D2, de la proteína LAG-3, preferentemente la proteína LAG-3 humana.

El derivado de la proteína LAG-3 puede comprender una secuencia de aminoácidos de los dominios D1, D2, D3, y opcionalmente D4, de la proteína LAG-3, preferentemente la proteína LAG-3 humana.

El derivado de la proteína LAG-3 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de identidad de aminoácidos con el dominio D1, D2 y D3, o con el dominio D1, D2, D3 y D4, de la proteína LAG-3, preferentemente LAG-3 humana.

La identidad de secuencia entre secuencias de aminoácidos puede determinarse comparando una alineación de las secuencias. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por el mismo aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La puntuación de una alineación con un porcentaje de identidad es una función del número de aminoácidos idénticos en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Cuando se comparan secuencias, las alineaciones óptimas pueden requerir la introducción de huecos en una o más de las secuencias para tener en cuenta posibles inserciones y deleciones en las secuencias. Los métodos de comparación de secuencias pueden emplear penalizaciones de hueco de modo que, para el mismo número de moléculas idénticas en secuencias que se están comparando, una alineación de secuencias con la mínima cantidad posible de huecos, que refleje mayor relación entre las dos secuencias

comparadas, conseguirá una mayor puntuación que una con muchos huecos. El cálculo del porcentaje máximo de identidad implica la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco.

Los programas informáticos adecuados para realizar comparaciones de secuencia están ampliamente disponibles en el sector comercial y público. Los ejemplos incluyen MatGat (Campanella et al., 2003, BMC Bioinformatics 4: 29; programa disponible en <http://bitincka.com/ledion/matgat>), Gap (Needleman & Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), FASTA (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; programa disponible en <http://www.ebi.ac.uk/fasta>), Clustal W 2.0 y X 2.0 (Larkin et al., 2007, Bioinformatics 23: 2947-2948; programa disponible en <http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2>) y algoritmos de alineación por pares EMBOSS (Needleman y Wunsch, 1970, supra; Kruskal, 1983, en: Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, Sankoff & Kruskal (eds), pág. 1-44, Addison Wesley; programas disponibles en <http://www.ebi.ac.uk/tools/emboss/align>). Todos los programas pueden ejecutarse usando parámetros por defecto.

Por ejemplo, pueden emprenderse comparaciones de secuencia usando el método de "needle" de los algoritmos de alineación por pares EMBOSS, que determina una alineación óptima (incluyendo huecos) de dos secuencias cuando se consideran sobre su longitud completa y proporciona una puntuación de porcentaje de identidad. Los parámetros por defecto para comparaciones de secuencias de aminoácidos (opción "molécula proteínica") puede ser penalización por extensión de hueco: 0,5, penalización por abertura de hueco: 10,0, Matriz: Blosum 62.

La comparación de secuencias puede realizarse sobre la longitud completa de la secuencia de referencia.

El derivado de la proteína LAG-3 puede fusionarse a la secuencia de aminoácidos de Fc de inmunoglobulina, preferentemente la secuencia de aminoácidos de Fc de IgG1 humana, opcionalmente mediante una secuencia de aminoácidos enlazadora.

La capacidad de un derivado de proteína LAG-3 de unirse a moléculas MHC de clase II puede determinarse usando un ensayo de adhesión celular cuantitativo como se describe en Huard *et al.*, (supra). La afinidad de un derivado de proteína LAG-3 por moléculas MHC de clase II puede ser de al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la afinidad de la proteína LAG-3 humana por moléculas de clase II. Preferentemente, la afinidad de un derivado de proteína LAG-3 por moléculas MHC de clase II es al menos un 50 % de la afinidad de la proteína LAG-3 humana por moléculas de clase II.

Los ejemplos de derivados adecuados de proteína LAG-3 que pueden unirse a moléculas MHC de clase II incluyen derivados que comprenden:

los restos de aminoácido 23 A 448 de la secuencia de LAG-3 humana;

la secuencia de aminoácidos de los dominios D1 y D2 de LAG-3;

la secuencia de aminoácidos de los dominios D1 y D2 de LAG-3 con una sustitución de aminoácidos en una o más de las siguientes posiciones: posición 73 donde ARG está sustituida con GLU; posición 75 donde ARG está sustituida con ALA o GLU; posición 76 donde ARG está sustituida con GLU; posición 30 donde ASP está sustituida con ALA; posición 56 donde HIS está sustituida con ALA; posición 77 donde TYR está sustituida con PHE; posición 88 donde ARG está sustituida con ALA; posición 103 donde ARG está sustituida con ALA; posición 109 donde ASP está sustituida con GLU; posición 115 donde ARG está sustituida con ALA;

la secuencia de aminoácidos del dominio D1 de LAG-3 con una delección de los restos de aminoácido 54 a 66;

una proteína de fusión de LAG-3Ig humana soluble recombinante (IMP321), un dímero de 200 kDa producido en células de ovario de hámster chino transfectadas con un plásmido que codifica el dominio extracelular de hLAG-3 fusionado a Fc de IgG1 humana.

De acuerdo con la invención, también se proporciona una composición farmacéutica, que comprende (a) proteína LAG-3, o un derivado de la misma que es capaz de unirse a moléculas MHC de clase II; y (b) un agente antineoplásico, donde el agente antineoplásico es un agente antineoplásico basado en platino o un inhibidor de topoisomerasa I; y (c) un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la invención, se proporciona además una preparación combinada, o composición farmacéutica, de la invención para su uso como medicamento.

La invención también proporciona una preparación combinada, o composición farmacéutica, de la invención para prevenir, tratar o mejorar el cáncer.

Se proporciona además de acuerdo con la invención el uso de una preparación combinada, o composición farmacéutica, de la invención en la fabricación de un medicamento para prevenir, tratar o mejorar el cáncer.

También se proporciona la composición reivindicada para su uso en un método de prevención, tratamiento o mejora

del cáncer, que comprende administrar proteína LAG-3, o un derivado de la misma que es capaz de unirse a moléculas MHC de clase II, y un agente antineoplásico, a un sujeto que necesita dicha prevención, tratamiento o mejora, donde el agente antineoplásico es un agente antineoplásico basado en platino o un inhibidor de topoisomerasa I.

5 La proteína LAG-3, o derivado de la misma, y el agente antineoplásico pueden administrarse secuencialmente al sujeto, es decir, la proteína LAG-3, o derivado de la misma, puede administrarse antes, con o después del agente antineoplásico.

10 La proteína LAG-3, o derivado de la misma, y un agente antineoplásico pueden administrarse al sujeto dentro de las 96 horas, 72 horas, 48 horas, 24 horas o 12 horas, entre sí.

15 Como alternativa, la proteína LAG-3, o derivado de la misma, y el agente antineoplásico pueden administrarse de manera conjunta al sujeto, por ejemplo, como una composición que comprende la proteína LAG-3, o derivado de la misma, y el agente antineoplásico o por administración simultánea de dosis diferentes de la proteína LAG-3, o derivado de la misma, y el agente antineoplásico.

20 De acuerdo con algunas realizaciones, se administra al sujeto una pluralidad de dosis de la proteína LAG-3 o derivado de la misma y/o una pluralidad de dosis del agente antineoplásico.

De acuerdo con algunas realizaciones, se administra una dosis de la proteína LAG-3 o derivado de la misma, antes, con o después de cada administración de dos o más dosis del agente antineoplásico.

25 Por ejemplo, puede administrarse una dosis de la proteína LAG-3 o derivado de la misma, dentro de las 96 horas, 72 horas, 48 horas, 24 horas o 12 horas, de cada administración de dos o más dosis del agente antineoplásico.

30 La elección de dosificaciones apropiadas de los componentes usados en tratamiento de combinación de acuerdo con la presente invención puede determinarse y optimizarse por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante observación del paciente, incluyendo la salud general del paciente y la respuesta al tratamiento de combinación. La optimización, por ejemplo, puede ser necesaria si se determina que un paciente no está mostrando el efecto terapéutico deseado o a la inversa, si el paciente está experimentando efectos secundarios indeseables o adversos que son demasiado numerosos o son de gravedad problemática.

35 Las dosis de los componentes usados en tratamiento de combinación de acuerdo con la invención deben elegirse para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de los componentes en la combinación. Una "cantidad eficaz" del tratamiento de combinación puede ser una cantidad que da como resultado una reducción de al menos un parámetro patológico asociado con el cáncer. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una cantidad eficaz del tratamiento de combinación es una cantidad que es eficaz para conseguir una reducción de al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, en el parámetro, en comparación con la reducción esperada en el parámetro asociado con el cáncer sin el tratamiento de combinación. Por ejemplo, el parámetro puede ser crecimiento tumoral.

45 De acuerdo con la invención, el tratamiento de combinación puede emplearse para aumentar el efecto terapéutico del agente antineoplásico, o proteína LAG-3, o derivado de la misma, en comparación con el efecto del agente antineoplásico, o proteína LAG-3, o derivado de la misma, como una monoterapia, o para disminuir las dosis de los componentes individuales en las combinaciones resultantes evitando al mismo tiempo o reduciendo adicionalmente el riesgo de efectos secundarios indeseados o peligrosos de los componentes individuales.

50 En una realización, la proteína LAG-3, o derivado de la misma, y el agente antineoplásico se prescriben cada uno a una dosis que está dentro de un intervalo de dosis típicamente prescrito para cada compuesto como monoterapia. Los compuestos pueden prescribirse como dosificaciones separadas o como una dosificación de combinación. Dichas combinaciones proporcionan eficacia aumentada en comparación con el efecto de cualquier compuesto como una monoterapia.

55 En otra realización, la proteína LAG-3, o derivado de la misma, y el agente antineoplásico se prescriben cada uno a una dosis que está por debajo de dosis típicamente prescrita para cada componente como una monoterapia, pero a dosis que tienen eficacia terapéutica en combinación. Los componentes pueden prescribirse como dosificaciones separadas o como una dosificación de combinación. Las dosificaciones de los componentes en combinación pueden seleccionarse para proporcionar un nivel similar de eficacia terapéutica que la proteína LAG-3, o derivado de la misma, o el agente antineoplásico como una monoterapia, pero con la ventaja de que las dosis inferiores de la proteína LAG-3, o derivado de la misma, y del agente antineoplásico reducen el riesgo de efectos secundarios adversos en comparación con las dosificaciones prescritas de cada compuesto como una monoterapia.

65 En otra realización, la dosificación prescrita del agente antineoplásico está dentro de un intervalo de dosis típicamente prescrito para monoterapia, y la proteína LAG-3, o derivado de la misma, se prescribe a una dosificación que está por debajo de una dosis típicamente prescrita para monoterapia.

En una realización adicional, la dosificación prescrita del agente antineoplásico está por debajo de una dosis típicamente prescrita para monoterapia, y la proteína LAG-3, o derivado de la misma, se prescribe a una dosificación que está dentro de un intervalo de dosis típicamente prescrito para monoterapia.

5 Las dosificaciones preferidas por debajo de la dosis típicamente prescrita para monoterapia son dosis que son hasta un 50 %, o hasta un 25 %, de la dosis típicamente prescrita.

10 Cuando se administra en dosificaciones separadas, la proteína LAG-3 o derivado de la misma y el agente antineoplásico pueden administrarse de forma sustancialmente simultánea (por ejemplo, en aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 5 minutos, o aproximadamente 1 minuto entre sí) o separados en el tiempo en aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 72 horas o aproximadamente 96 horas o más.

15 El experto en la materia será capaz de determinar y optimizar, un ciclo temporal adecuado para la administración secuencial, dependiendo de la combinación particular de la proteína LAG-3 o derivado de la misma y el agente antineoplásico. El ciclo temporal se selecciona preferentemente de modo que haya al menos un efecto beneficioso, por ejemplo, una potenciación del efecto de la proteína LAG-3 o derivado de la misma o el agente antineoplásico o una potenciación mutua del efecto de los componentes en combinación, por ejemplo, un efecto más que aditivo, efectos ventajosos adicionales, menos efectos secundarios, menos toxicidad o un efecto terapéutico combinado en comparación con una dosificación no eficaz de uno o ambos componentes de la combinación, y muy preferentemente sinergia de los componentes de la combinación.

20 Se apreciará que el ciclo temporal óptimo dependerá de factores tales como el tiempo que tarda la concentración en plasma máxima del compuesto en alcanzarse después de la administración, y la semivida de eliminación de cada compuesto. Preferentemente, la diferencia temporal es menor que la semivida del primer componente a administrar.

30 El experto en la materia será capaz de determinar la cronología apropiada para la administración. En determinadas realizaciones, el agente antineoplásico puede administrarse por la mañana y la proteína LAG-3, o derivado de la misma, puede administrarse al menos una vez más tarde en el día. En otras realizaciones, el agente antineoplásico y la proteína LAG-3 o derivado de la misma, pueden administrarse sustancialmente al mismo tiempo.

35 En algunas realizaciones, el agente antineoplásico se administra al sujeto, por ejemplo, mediante un facultativo médico y al sujeto se le puede proporcionar una dosis de la proteína LAG-3 o derivado de la misma, por ejemplo, en una jeringa precargada, para administrarse posteriormente (por ejemplo, después el mismo día o al siguiente día).

40 El sujeto puede recibir dosis del el agente antineoplásico y proteína LAG-3 o derivado de la misma, durante un periodo de semanas, meses o años. Por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o más.

45 Preferentemente el sujeto es un sujeto mamífero, más preferentemente, un sujeto humano.

Los ejemplos de cánceres que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen sarcoma de mama, de ovario, de pulmón, de cabeza, de cuello, de endometrio, de esófago, de vejiga, de cuello de útero, osteogénico, cáncer de colon, colorrectal, linfoma y tumores de células germinales o del sistema nervioso central.

50 En general, los componentes de una combinación de la invención, o una composición de la invención, pueden administrarse por medios conocidos, en cualquier formulación adecuada, por cualquier vía adecuada. En algunas realizaciones, la proteína LAG-3 o derivado de la misma, se administra por vía parenteral (incluyendo inyección subcutánea, intravenosa o intramuscular). En algunas realizaciones, el agente antineoplásico se administra por vía intravenosa. En realizaciones particulares, la proteína LAG-3 o derivado de la misma, se administra por vía subcutánea y el agente antineoplásico se administra por vía intravenosa.

55 Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación adecuadas pueden prepararse usando métodos convencionales conocidos para los expertos en el campo de la formulación farmacéutica y se describen en los textos y la bibliografía relevantes, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995).

60 Es especialmente ventajoso formular combinaciones o composiciones de la invención en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "formas de dosificación unitarias", como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los individuos a tratar. Es decir, las composiciones se formulan en unidades de dosificación discretas, conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada de "dosis unitaria" de un agente

activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. Las especificaciones de formas de dosificación unitarias de la invención dependen de las características únicas del agente activo a suministrar. Las dosificaciones pueden determinarse además por referencia a la dosis y la manera de administración habitual de los ingredientes. Debe apreciarse que, en algunos casos, dos o más unidades de dosificación individuales en combinación proporcionan una cantidad terapéuticamente eficaz del agente activo, por ejemplo, dos comprimidos o cápsulas tomadas juntas pueden proporcionar una dosificación terapéuticamente eficaz, de modo que la dosificación unitaria en cada comprimido o cápsula es aproximadamente un 50 % de la cantidad terapéuticamente eficaz.

Las preparaciones de acuerdo con la invención para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas y no acuosas estériles. Las soluciones acuosas inyectables contienen el agente activo en forma soluble en agua. Los ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos incluyen aceites grasos, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, alcoholes de bajo peso molecular tales como propilenglicol, polímeros hidrófilos sintéticos tales como polietilenglicol, liposomas y similares. Las formulaciones parenterales también pueden contener adyuvantes tales como solubilizantes, conservantes, agentes humectantes, emulsionantes, dispersantes y estabilizantes, y las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y dextrano. Las formulaciones inyectables pueden volverse estériles mediante la incorporación de un agente de esterilización, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, radiación o calor. También pueden fabricarse usando un medio inyectable estéril. El agente activo también puede estar en forma seca, por ejemplo, liofilizada, que puede rehidratarse con un vehículo adecuado inmediatamente antes de la administración mediante inyección.

Además de las formulaciones descritas previamente, el agente activo puede formularse como una preparación de depósito para liberación controlada del agente activo, preferentemente liberación sostenida durante un periodo de tiempo prolongado. Estas formas de dosificación de liberación sostenida se administran en general por implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular o mediante inyección intramuscular).

Las preparaciones combinadas de la invención pueden envasarse con instrucciones para la administración de los componentes de la combinación. Las instrucciones pueden estar grabadas en un medio de grabación o sustrato adecuado. Por ejemplo, las instrucciones pueden estar impresas en un sustrato, tal como papel o plástico. Las instrucciones pueden estar presentes como un prospecto, en la etiqueta del recipiente o los componentes del mismo (es decir, asociadas con el envase o subenvase). En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, por ejemplo, CD-ROM, disquete. Algunos o todos los componentes de la preparación combinada pueden envasarse en envases adecuados para mantener la esterilidad.

Las realizaciones de la invención se describen en los ejemplos a continuación, con referencia a los dibujos adjuntos en que:

la Figura 1 muestra el efecto de la administración de un derivado de LAG-3 y Topotecán en el tratamiento del cáncer;

la Figura 2 muestra el efecto de la administración de un derivado de LAG-3 y Carboplatino en el tratamiento del cáncer;

la Figura 3 muestra el efecto de la administración de (A) un derivado de LAG-3 y Carboplatino, o (B) un derivado de LAG-3 y Oxaliplatino en el tratamiento del cáncer;

la Figura 4 muestra el efecto de la administración de un derivado de LAG-3 y Oxaliplatino en el tratamiento del cáncer: (A) muestra el efecto sobre el tamaño del tumor, y (B) muestra el efecto sobre la supervivencia;

la figura 5 muestra una ilustración de derivados de proteína LAG-3 fusionados a la secuencia de Fc de inmunoglobulina (IgFc);

la figura 6 muestra la unión de derivados de LAG-3 a células MHC de clase II positivas;

la figura 7 muestra la inhibición de la unión de un derivado de LAG-3 a células MHC de clase II positivas por anticuerpos que bloquean la unión de LAG-3 a moléculas MHC de clase II;

la figura 8 muestra la activación de células THP-1 por derivados de LAG-3, determinada por la secreción de CCL4;

la figura 9 muestra la activación de células THP-1 por derivados de LAG-3, determinada por la secreción de TNF- α ;

la figura 10 muestra la inhibición de la activación de monocitos inducida por derivado de LAG por anticuerpos que bloquean la unión de LAG-3 a moléculas MHC de clase II;

la figura 11 muestra la activación de células presentadoras de antígeno (APC) por derivaos de LAG-3;

la figura 12 muestra la activación de linfocitos T CD8 positivos por derivados de LAG-3; y

la figura 13 muestra la secuencia de amino ácidos de la proteína LAG-3 humana madura. Los cuatro dominios extracelulares de la superfamilia de Ig están en los restos de aminoácidos: 1-149 (D1); 150-239 (D2); 240-330 (D3); y 331-412 (D4). La secuencia de aminoácidos de la estructura del bucle adicional del dominio D1 de la proteína LAG-3 humana se muestra subrayada en negra.

Ejemplo 1

Efecto de la administración de un derivado de LAG-3 y un inhibidor de topoisomerasa I en el tratamiento del cáncer

Se estableció un modelo de tumor de piel singénico murino utilizando la línea celular de adenocarcinoma colorrectal CT26.

Se implantó un cuarto de la dosis tumorigénica mínima (MTD) de células tumorales ($0,5 \times 10^5$ células) mediante inyección subcutánea (s.c.) en el flanco derecho de cuatro grupos de ratones BALB/c (5 semanas de edad) en el Día 0. Los ratones se inyectaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (ratones del Grupo 1), el derivado de LAG-3 IMP321 (ratones del Grupo 2), IMP321 y Topotecán (ratones del Grupo 3), o Topotecán solo (ratones del Grupo 4) de acuerdo con el siguiente programa:

Grupo 1 (8 ratones): *control negativo*: inyección s. c. de PBS en D11, D14, D18, D21, D25 y D28;

Grupo 2 (7 ratones): inyección s.c. de IMP321 (50 μ g, 1.9 mg/ml) en D11, D14, D18, D21, D25 y D28;

Grupo 3 (8 ratones): inyección s.c. de IMP321 (50 μ g, 1.9 mg/ml) en D11, D14, D18, D21, D25 y D28, más inyección i. p. de Topotecán (45 μ g, 2.5 mg/kg) en D10, D13 y D17;

Grupo 4 (8 ratones): inyección i.p. de Topotecán (45 μ g, 2.5 mg/kg) en D10, D13 y D17.

El crecimiento tumoral se controló dos veces a la semana midiendo dos diámetros tumorales perpendiculares utilizando calibradores. Los resultados se muestran en la Figura 1. Tamaño del tumor significa el área de la sección transversal en mm^2 .

Los resultados muestran que IMP321 solo no tuvo efecto en el crecimiento del tumor, topotecán tuvo algún efecto en la reducción del crecimiento del tumor, pero el tratamiento combinado con IMP321 y el topotecán tiene un efecto mayor (es decir, sinérgico).

Ejemplo 2

Efecto de la administración de un derivado de LAG-3 y un agente antineoplásico basado en platino en el tratamiento del cáncer

Se estableció un modelo de tumor de piel singénico murino utilizando la línea celular de linfoma EL4.

Se implantó la dosis tumorigénica mínima (MTD) de células tumorales (5×10^5 células) mediante inyección s.c. en el flanco derecho de ratones C57Bl/6 (5 semanas de edad) en el Día 0. Los ratones se inyectaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (ratones del Grupo 1), IMP321 (ratones del Grupo 2), IMP321 y Carboplatino (ratones del Grupo 3), o Carboplatino solo (ratones del Grupo 4) de acuerdo con el siguiente programa:

Grupo 1 (8 ratones): *control negativo*: inyección s.c. de PBS en D7, D11, D14, D19, D21 y D24;

Grupo 2 (8 ratones): inyección s.c. de IMP321 (50 μ g, 3.96 mg/ml) en D7, D11, D14, D19, D21 y D24;

Grupo 3 (8 ratones): inyección s.c. de IMP321 (50 μ g, 3.96 mg/ml) en D7, D11, D14, D19, D21 y D24, más inyección i. p. de Carboplatino (288 μ g, 16 mg/kg) en D6, D10, D13 y D17;

Grupo 4 (8 ratones): inyección i.p. de Carboplatino (288 μ g, 16 mg/kg) en D6, D10, D13 y D17.

El crecimiento tumoral se controló dos veces a la semana midiendo dos diámetros tumorales perpendiculares utilizando calibradores. Los resultados se muestran en la Figura 2. Tamaño del tumor significa el área de la sección

transversal en mm².

Los resultados muestran que IMP321 solo no tuvo efecto en el crecimiento del tumor, el carboplatino solo tuvo muy poco efecto, si lo hubo, pero el tratamiento combinado con IMP321 y carboplatino redujo el crecimiento tumoral, demostrando así un efecto sinérgico de la administración combinada.

Ejemplo 3

Efecto de la administración de un derivado de LAG-3 y diferentes agentes antineoplásicos basados en platino en el tratamiento del cáncer

Se estableció un modelo de tumor de piel singénico murino utilizando la línea celular de linfoma EL4.

Se implantó la dosis tumorigénica mínima (MTD) de células tumorales (5×10^5 células) mediante inyección s.c. en el flanco derecho de ratones C57Bl/6 (5 semanas de edad) en el Día 0. Los ratones se inyectaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (ratones del Grupo 1), IMP321 (ratones del Grupo 2), IMP321 y Carboplatino (ratones del Grupo 3), Carboplatino solo (ratones del Grupo 4), IMP321 y Oxaliplatino (ratones del Grupo 5), u Oxaliplatino solo (ratones del Grupo 6) de acuerdo con el siguiente programa:

- Grupo 1 (10 ratones): *control negativo*: inyección s.c. de PBS en D7, D11, D14, D18, D21 y D25;
- Grupo 2 (10 ratones): inyección s.c. de IMP321 (50 µg, 1.9 mg/ml) en D7, D11, D14, D18, D21 y D25;
- Grupo 3 (9 ratones): inyección s.c. de IMP321 (50 µg, 1.9 mg/ml) en D7, D11, D14, D18, D21 y D25, más inyección i. p. de Carboplatino (288 µg, 16 mg/kg) en D6, D10, D13 y D17;
- Grupo 4 (10 ratones): inyección i.p. de Carboplatino (288 µg, 16 mg/kg) en D6, D10, D13 y D17;
- Grupo 5 (10 ratones): inyección s.c. de IMP321 (50 µg, 1.9 mg/ml) en D7, D11, D14, D18, D21 y D25, más inyección i. p. de Oxaliplatino (54 µg, 3 mg/kg) en D6 y D10;
- Grupo 6 (10 ratones): inyección i.p. de Oxaliplatino (54 µg, 3 mg/kg) en D6 y D10.

El crecimiento tumoral se controló dos veces a la semana midiendo dos diámetros tumorales perpendiculares utilizando calibradores. Los resultados se muestran en la Figura 3A (para Carboplatino) y en la Figura 3B (para Oxaliplatino). Tamaño del tumor significa el área de la sección transversal en mm².

Los resultados muestran que IMP321 solo tuvo muy poco efecto, si lo hubo, el carboplatino solo tuvo algún efecto, y el tratamiento combinado con IMP321 y carboplatino tuvo un efecto mayor (es decir, sinérgico). El oxaliplatino solo tuvo un efecto, pero el tratamiento combinado con IMP321 y el oxaliplatino tuvo un efecto aún mayor (es decir, sinérgico), con el crecimiento tumoral completamente inhibido en el día 17.

Ejemplo 4

Efecto de la administración de un derivado de LAG-3 y un agente antineoplásico basado en platino en el tratamiento del cáncer

Se evaluó el efecto del tratamiento combinado con el derivado de LAG-3 IMP321 (también denominado hLAG-3lg) y oxaliplatino en el modelo de tumor de adenocarcinoma de colon C38. En este modelo, los fragmentos tumorales se implantan quirúrgicamente por vía subcutánea. Cuando se inicia el tratamiento (en el día 12, cuando el volumen medio del tumor es de 200 mm³), el tumor está relativamente maduro y, por lo tanto, proporciona un buen modelo para los tumores de la vida real.

Los fragmentos de tumor de colon 38 de ratón (C38) se obtuvieron congelados de la Division of Cancer Treatment, Tumor Repository, NCI (Frederick, MD, EE. UU.). Los fragmentos de C38 se almacenaron congelados en medio DMSO/SVF/RPMI 1640 (10/10/80) en nitrógeno líquido hasta su uso. Los fragmentos se descongelaron a 37 °C durante 5 min, se enjuagaron dos veces en medio RPMI 1640 antes de la implantación subcutánea (SC) en ratones. Los tumores C38 se trasplantaron en serie en ratones C57Bl/6.

Se implantaron subcutáneamente pequeños fragmentos de tumor C38 (20-30 mg) en el flanco derecho de 12 ratones C57BL/6. Cuando el tamaño del tumor alcanzó 500-1000 mm³, los tumores se extirparon quirúrgicamente y se implantaron subcutáneamente pequeños fragmentos de tumor C38 (20-30 mg) en el flanco derecho de los ratones receptores C57BL/6.

El tratamiento comenzó cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 200 -300 mm³. El programa de tratamiento fue el siguiente:

- Grupo 1 (10 ratones): una inyección SC semanal de PBS durante 4 semanas consecutivas;
- Grupo 2 (10 ratones): una inyección IV semanal de oxaliplatino a 5 mg/kg/inj durante 4 semanas consecutivas;
- Grupo 3 (10 ratones): una inyección SC semanal de 20 µg de IMP321 durante 4 semanas consecutivas;
- Grupo 4 (10 ratones): una inyección IV semanal de oxaliplatino a 5 mg/kg/inj en combinación con una inyección

SC semanal de 20 µg de IMP321 durante 4 semanas consecutivas.

El tratamiento comenzó el día 12 (D12) cuando los diferentes grupos tenían un volumen tumoral medio de 200 mm³. Se inyectó PBS u Oxaliplatino en D12, D19, D26 y D33. IMP321 se inyectó el día después de Oxaliplatino, es decir, en D13, D20, 27 y D34. Los animales se terminaron cuando el tumor subcutáneo alcanzó un volumen máximo de 2.000 mm³.

Grupo	Tratamiento	Dosis	Vía de administración	Programa de tratamiento
1	PBS	-	SC	Q7Dx4
2	Oxaliplatino	5 mg/kg/iny	IV	Q7Dx4
3	IMP321	20 µg/ratón/iny	SC	Q7Dx4*
4	Oxaliplatino	5 mg/kg/iny	IV	Q7Dx4
	IMP321	20 µg/ratón/iny	SC	Q7Dx4*
realizado el día después del tratamiento con oxaliplatino				

Los resultados se muestran en la Figura 4A. Los resultados muestran que IMP321 solo no tuvo efecto en retrasar el crecimiento del tumor. El oxaliplatino tuvo un ligero efecto. La combinación de Oxaliplatino e IMP321 tuvo un efecto mayor. El mismo efecto sinérgico se ve en las curvas de supervivencia, que se muestran en la Figura 4B.

Ejemplo 5

Unión de derivados de LAG-3 a células MHC de clase II positivas

Se ensayaron varios derivados de LAG-3 para su capacidad de unirse a células MHC de clase II positivas:

- i) dominios D1-D4 de LAG-3 unidos a la secuencia Fc de inmunoglobulina (Fc de Ig) mediante un primer enlazador (LAG-3 D1D4-enlazador1-Ig, sLAG-3 D1D4-Ig o IMP321);
- ii) dominios D1-D4 de LAG-3, unidos a la secuencia Fc de Ig mediante un segundo enlazador (LAG-3 D1D4-enlazador2-Ig o sLAG-3 D1D4-enlazadorB-Ig);
- iii) dominios D1 y D2 de LAG-3, unidos a la secuencia Fc de Ig mediante el segundo enlazador (LAG-3 D1D2-enlazador2-Ig o sLAG-3 D1D2-enlazadorB-Ig); y
- iv) dominios D1-D4 de LAG-3 unidos a la secuencia Fc de Ig mediante el primer enlazador, pero con una mutación en el sitio de unión a MHC de clase II del dominio D1 de LAG-3, en la posición R75 (R75A), que potencia la unión a moléculas MHC de clase II en tres veces o más (Huard et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94:5744) (IMP321 R75A).

Los derivados se ilustran en la figura 5.

Se incubaron células Raji MHC de clase II+ durante 45 minutos a 4 °C con diversas concentraciones de los derivados de LAG-3, o con un anticuerpo IgG1 humano (hIgG1) como control negativo. Las moléculas de LAG-3 unidas a la superficie celular se revelaron con un anti Ig de ratón de cabra conjugado a FITC (Coulter). Las células se analizaron por citometría de flujo. Los resultados, expresados como unidades de intensidad de fluorescencia, se muestran en la figura 6. Los resultados muestran que todos los derivados de LAG-3 se unían a células MHC de clase II positivas.

Ejemplo 6

Inhibición de la unión del derivado de LAG-3 IMP321 a células MHC de clase II positivas mediante anticuerpos que bloquean la unión de LAG-3 a moléculas MHC de clase II

17B4 y 11E3 son anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 que se sabe que bloquean la unión de LAG-3 a moléculas MHC de clase II. La unión de un conjugado IMP321-marcador (LAG-3Ig-Alexa 488) a linfocitos B MHC de clase II positivos (células Raji) se determinó después de preincubación del conjugado (4 µg/ml a 4 °C) con anticuerpo de bloqueo 17B4 u 11E3, o con un anticuerpo monoclonal de control negativo de isotipo coincidente (mIgG1). El análisis de la fluorescencia unida a células se realizó usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los resultados se muestran en la Figura 7.

Los resultados muestran que la unión de IMP321 a células Raji se inhibía por el anticuerpo monoclonal específico de LAG-3 que bloquea la unión de LAG-3 a moléculas MHC de clase II.

Ejemplo 7

Activación de monocitos mediante derivados de LAG-3

Se incubaron células THP-1 durante 4 horas a 4 °C con los derivados de LAG-3 ilustrados en la figura 5, o con IgG1

humana como control negativo. La cantidad de secreción mediante las células THP-1 de la quimiocina CCL4, y de la citocina factor de necrosis tumoral α , TNF- α , se determinó y se usó como medida de la activación de monocitos. Se cuantificó la secreción de CCL4 y TNF- α en los sobrenadantes celulares usando una matriz de microesferas citométricas. Los resultados de las determinaciones de CCL4 se muestran en la figura 8, y los resultados de las determinaciones de TNF- α se muestran en la figura 9.

Los resultados muestran que los derivados de LAG-3 pueden todos activar células monocíticas THP-1.

Ejemplo 8

Inhibición de activación de monocitos inducida por IMP321 por anticuerpos que bloquean la unión de LAG-3 a moléculas MHC de clase II

IMP321 (20 ng/ml) se incubó previamente con anticuerpo 17B4 u 11E3 (a +37 °C), antes de la incubación de la mezcla con células THP-1 durante 4 horas. La cantidad de secreción de CCL4 por las células THP-1 se usó para determinar el nivel de activación de monocitos. Los resultados de dos experimentos se muestran en la figura 10.

Los resultados demuestran que la activación de monocitos inducida por IMP321 se inhibe por los mAb anti-LAG-3 de bloqueo 17B4 y 11E3. Esto indica que la capacidad de IMP321 de activar monocitos depende de la unión de IMP321 a moléculas MHC de clase II.

Ejemplo 9

Activación de células presentadoras de antígeno (APC) primarias mediante derivados de LAG-3

Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas durante 4 horas con los derivados de LAG-3 ilustrados en la figura 5, o con IgG1 humana como control negativo, en presencia de brefeldina, un inhibidor de secreción. La respuesta de citocinas de las APC presentes en las PBMC se determinó mediante tinción intracelular de CCL4, una quimiocina que se sabe que favorece la respuesta Th1 y CD8 positiva, y TNF- α , una citocina multifuncional que inhibe directamente la tumorigénesis. Los resultados se analizaron por citometría. Los resultados, representados por el porcentaje de células que expresan CCL4 y/o TNF- α en células MHC de clase II positivas, se muestran en la figura 11.

Los resultados muestran que todos los derivados de LAG-3 ensayados inducían la producción de CCL4 y TNF- α .

Ejemplo 10

Activación de linfocitos T mediante derivados de LAG-3

Se incubaron PBMC humanas durante 18 horas con los derivados de LAG-3 ilustrados en la figura 5, o con IgG1 humana como control negativo. Estuvo presente brefeldina durante las últimas 16 horas de la incubación. La respuesta de citocinas de linfocitos T CD8positivos después de exposición de 18 horas a derivas de LAG-3 se siguió de tinción intracelular de CCL4, IFN- γ y TNF- α y se analizó por citometría. Los resultados, representados como el porcentaje de células que expresan CCL4, IFN- γ y/o TNF- α en linfocitos T CD3 positivos/CD8 positivos, se muestran en la figura 12.

Los resultados muestran que todos los derivados de LAG-3 ensayados inducían activación de linfocitos T CD8 positivos citotóxicos de tipo 1 (linfocitos Tc1). Se concluyó que, mediante la unión a moléculas MHC de clase II expresadas por las APC, los derivados de LAG-3 inducían la activación de linfocitos Tc1. La activación de linfocitos Tc1 forma la respuesta inmunitaria antitumoral principal.

LISTADO DE SEQUENCIAS

<110> Immutep S.A.

<120> Preparaciones Combinadas para el Tratamiento del Cáncer

<130> P/70762.WO01

<150> GB 1322626.1

<151> 19/12/2013

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

ES 2 730 976 T3

<211> 502
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 1

Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala
 1 5 10 15

Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu Ser
 20 25 30

Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly
 35 40 45

Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Pro
 50 55 60

Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr Thr Val Leu
 65 70 75 80

Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln Pro
 85 90 95

Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu
 100 105 110

Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala Ala
 115 120 125

Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg Leu
 130 135 140

Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser
 145 150 155 160

Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Ala

ES 2 730 976 T3

165 170 175
 Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val Arg
 180 185 190
 Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro Gln
 195 200 205
 Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr Arg
 210 215 220
 Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly Leu
 225 230 235 240
 Glu Pro Pro Thr Pro Leu Thr Val Tyr Ala Gly Ala Gly Ser Arg Val
 245 250 255
 Gly Leu Pro Cys Arg Leu Pro Ala Gly Val Gly Thr Arg Ser Phe Leu
 260 265 270
 Thr Ala Lys Trp Thr Pro Pro Gly Gly Gly Pro Asp Leu Leu Val Thr
 275 280 285
 Gly Asp Asn Gly Asp Phe Thr Leu Arg Leu Glu Asp Val Ser Gln Ala
 290 295 300
 Gln Ala Gly Thr Tyr Thr Cys His Ile His Leu Gln Glu Gln Gln Leu
 305 310 315 320
 Asn Ala Thr Val Thr Leu Ala Ile Ile Thr Val Thr Pro Lys Ser Phe
 325 330 335
 Gly Ser Pro Gly Ser Leu Gly Lys Leu Leu Cys Glu Val Thr Pro Val
 340 345 350
 Ser Gly Gln Glu Arg Phe Val Trp Ser Ser Leu Asp Thr Pro Ser Gln
 355 360 365
 Arg Ser Phe Ser Gly Pro Trp Leu Glu Ala Gln Glu Ala Gln Leu Leu
 370 375 380
 Ser Gln Pro Trp Gln Cys Gln Leu Tyr Gln Gly Glu Arg Leu Leu Gly
 385 390 395 400
 Ala Ala Val Tyr Phe Thr Glu Leu Ser Ser Pro Gly Ala Gln Arg Ser
 405 410 415

ES 2 730 976 T3

Gly Arg Ala Pro Gly Ala Leu Pro Ala Gly His Leu Leu Leu Phe Leu
420 425 430

Thr Leu Gly Val Leu Ser Leu Leu Leu Leu Val Thr Gly Ala Phe Gly
435 440 445

Phe His Leu Trp Arg Arg Gln Trp Arg Pro Arg Arg Phe Ser Ala Leu
450 455 460

Glu Gln Gly Ile His Pro Gln Ala Gln Ser Lys Ile Glu Glu Leu Glu
465 470 475 480

Gln Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu
485 490 495

Pro Glu Pro Glu Gln Leu
500

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 2

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
1 5 10 15

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Arg Arg Tyr
20 25 30

10

REIVINDICACIONES

1. Una preparación combinada, que comprende: (a) proteína LAG-3, o un derivado de la misma que puede unirse a moléculas MHC de clase II y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de aminoácidos con el dominio D1, y opcionalmente el dominio D2, de la proteína LAG-3; y (b) un agente antineoplásico, donde el agente antineoplásico es un agente antineoplásico basado en platino o un inhibidor de topoisomerasa I.
2. Una preparación combinada de acuerdo con la reivindicación 1, para la coadministración o administración secuencial de la proteína LAG-3 o derivado de la misma y el agente antineoplásico.
3. Una preparación combinada acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la proteína LAG-3 o derivado de la misma, está separada del agente antineoplásico.
4. Una preparación combinada de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde la proteína LAG-3 o derivado de la misma, está presente a una dosis que es un equivalente molar de 0,25-30 mg de proteína de fusión de LAG-3Ig IMP321.
5. Una preparación combinada de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende una pluralidad de dosis de la proteína LAG-3 o derivado de la misma.
6. Una preparación combinada de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende una pluralidad de dosis del agente antineoplásico.
7. Una preparación combinada de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el agente antineoplásico basado en platino comprende oxaliplatino o carboplatino.
8. Una preparación combinada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el inhibidor de topoisomerasa I es topotecán.
9. Una preparación combinada de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el derivado de proteína LAG-3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de aminoácidos con el dominio D1, y opcionalmente el dominio D2, de la proteína LAG-3 humana.
10. Una preparación combinada de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el derivado de la proteína LAG-3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de aminoácidos con los dominios D1, D2, D3, y opcionalmente D4, de la proteína LAG-3, preferentemente la proteína LAG-3 humana.
11. Una preparación combinada de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde el derivado de proteína LAG-3 se fusiona a la secuencia Fc de inmunoglobulina, preferentemente donde el derivado de proteína LAG-3 es la proteína de fusión de LAG-3Ig humana soluble recombinante IMP321.
12. Una composición farmacéutica, que comprende (a) proteína LAG-3, o un derivado de la misma que puede unirse a moléculas MHC de clase II y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de aminoácidos con el dominio D1, y opcionalmente el dominio D2, de la proteína LAG-3; y (b) un agente antineoplásico, donde el agente antineoplásico es un agente antineoplásico basado en platino o un inhibidor de topoisomerasa I; y (c) un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, donde el derivado de proteína LAG-3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de aminoácidos con el dominio D1, y opcionalmente el dominio D2, de la proteína LAG-3 humana.
14. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, donde el derivado de la proteína LAG-3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad de aminoácidos con los dominios D1, D2, D3, y opcionalmente D4, de la proteína LAG-3, preferentemente la proteína LAG-3 humana.
15. Una preparación combinada para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, para su uso como un medicamento.
16. Una preparación combinada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, para uso en la prevención, tratamiento o mejora del cáncer.
17. Una preparación combinada para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende una pluralidad de

dosis de la proteína LAG-3 o derivado de la misma y/o una pluralidad de dosis del agente antineoplásico, donde una dosis de la proteína LAG-3, o un derivado de la misma, es para la administración antes, con o después de cada administración de dos o más dosis del agente antineoplásico.

Figura 1

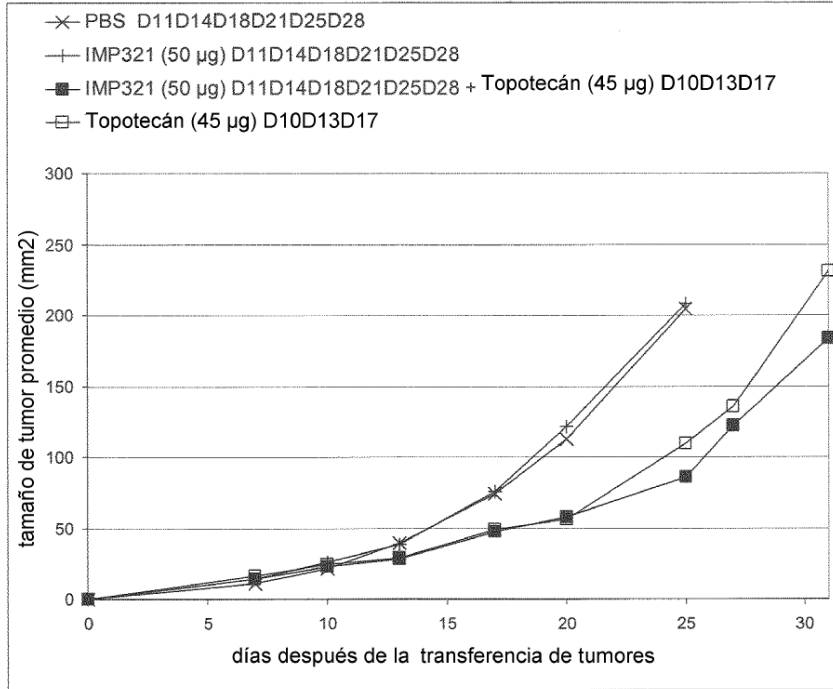


Figura 2

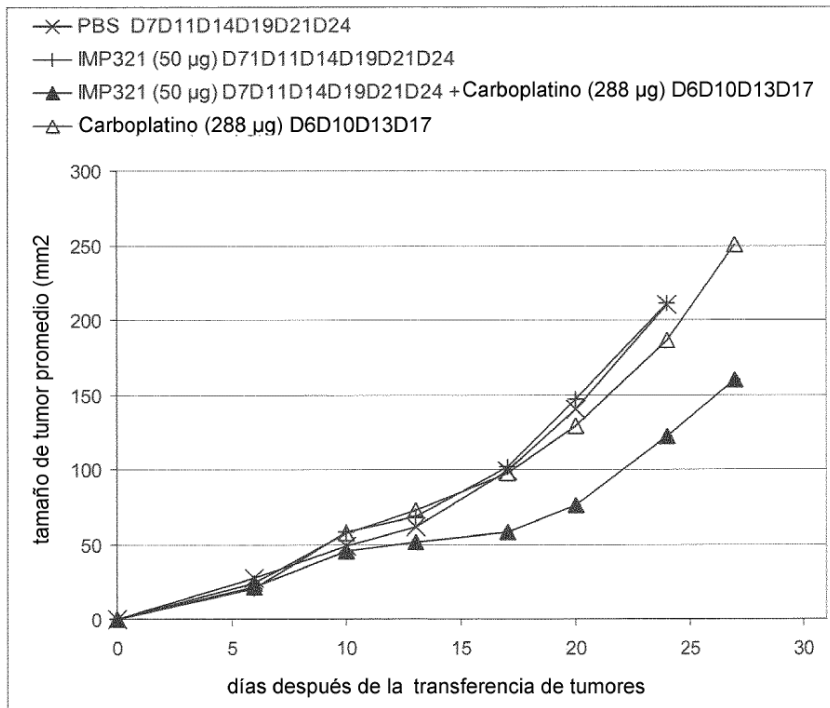
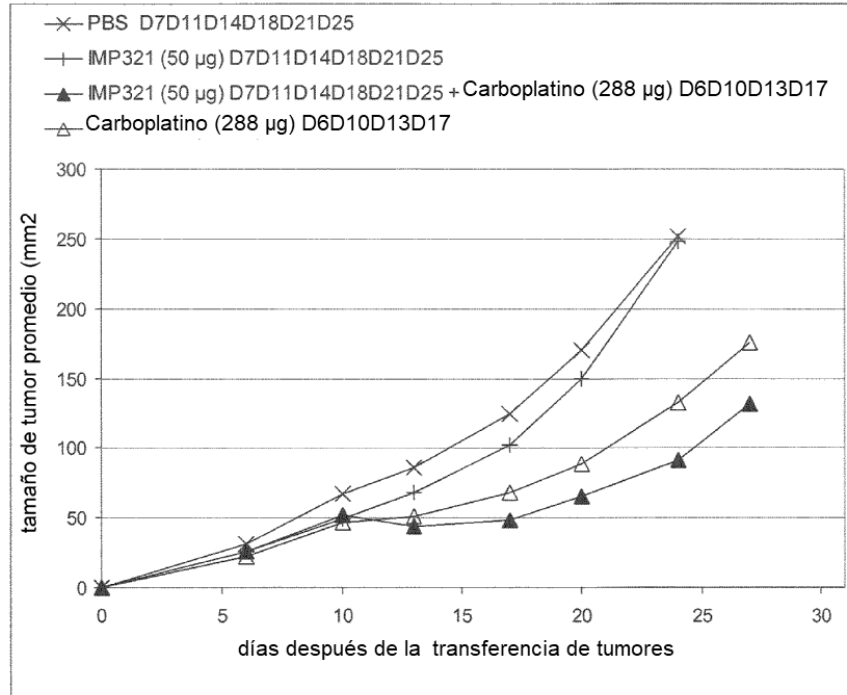


Figura 3

A)



B)

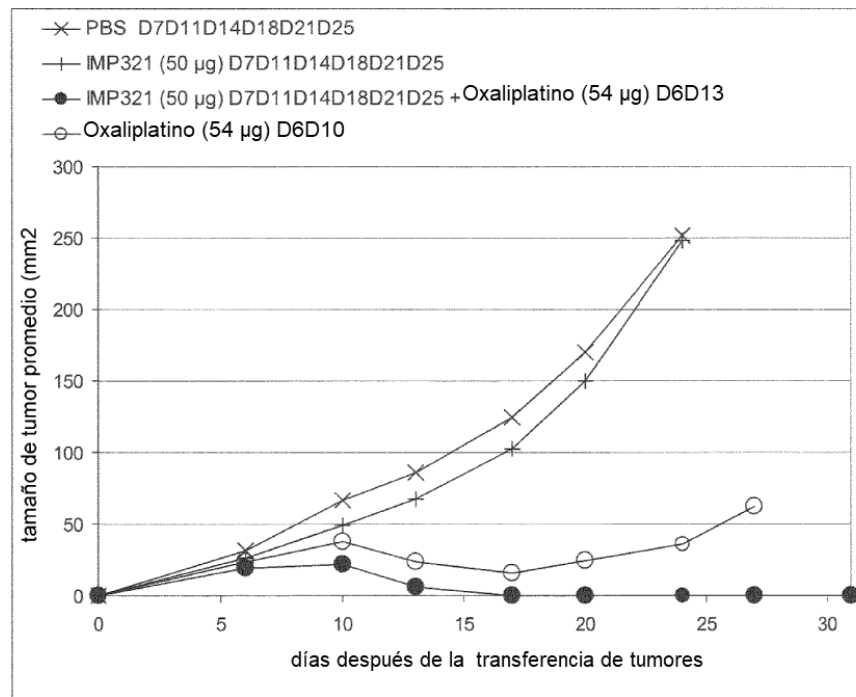
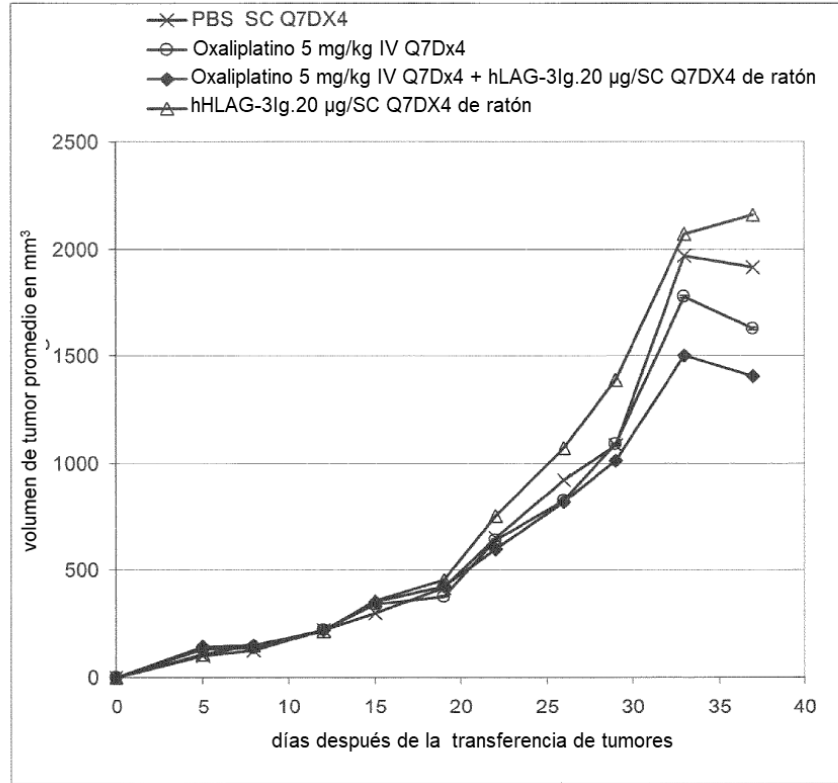


Figura 4

A)



B)

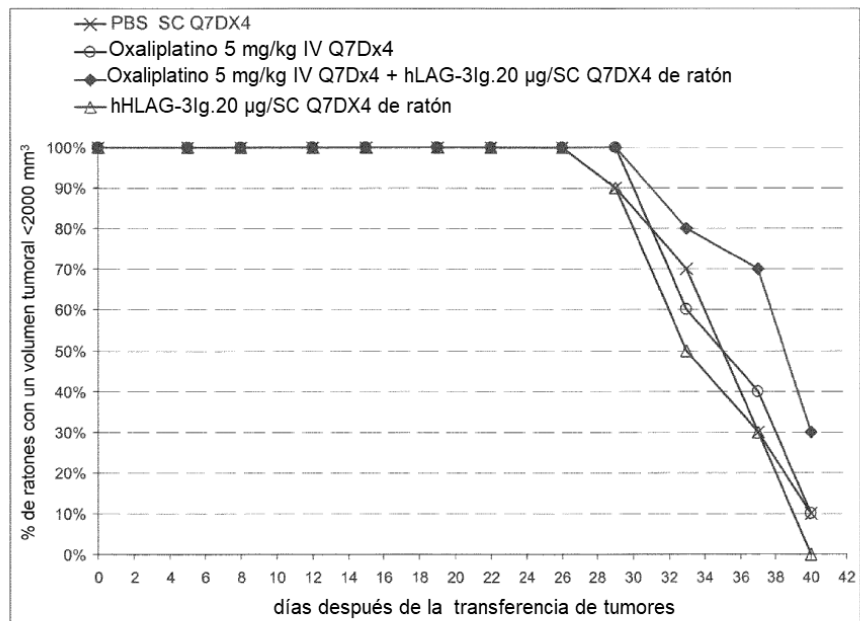


Figura 5

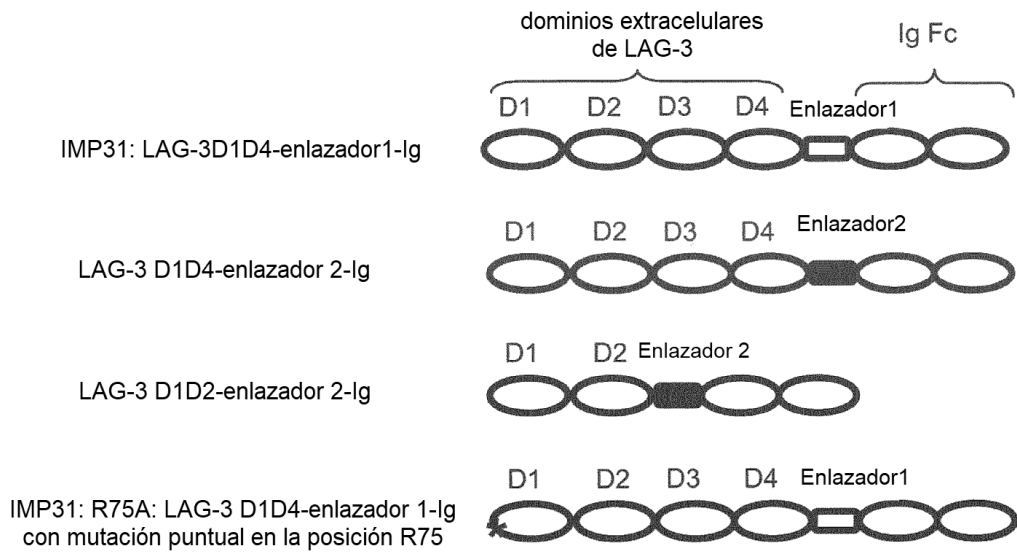


Figura 6

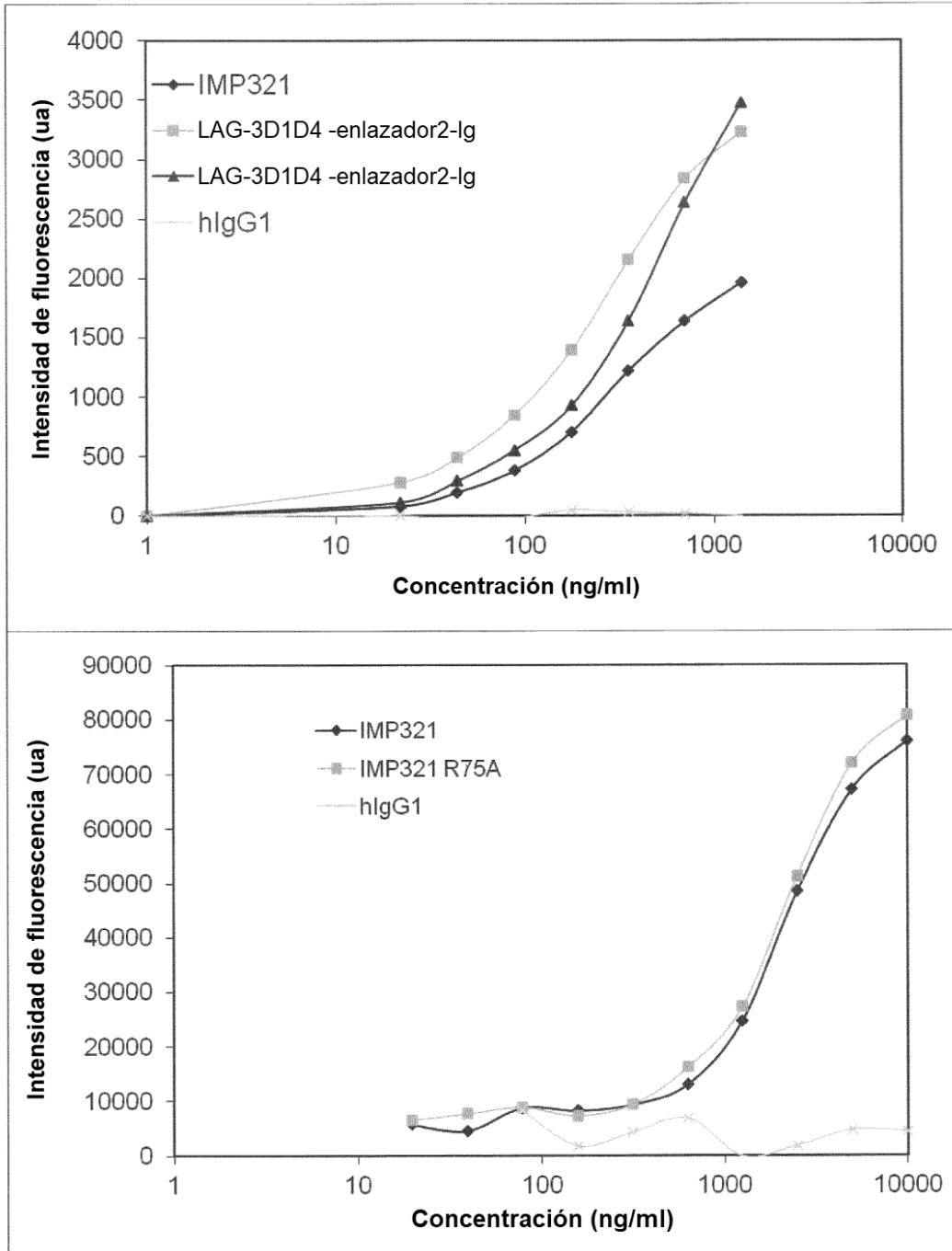
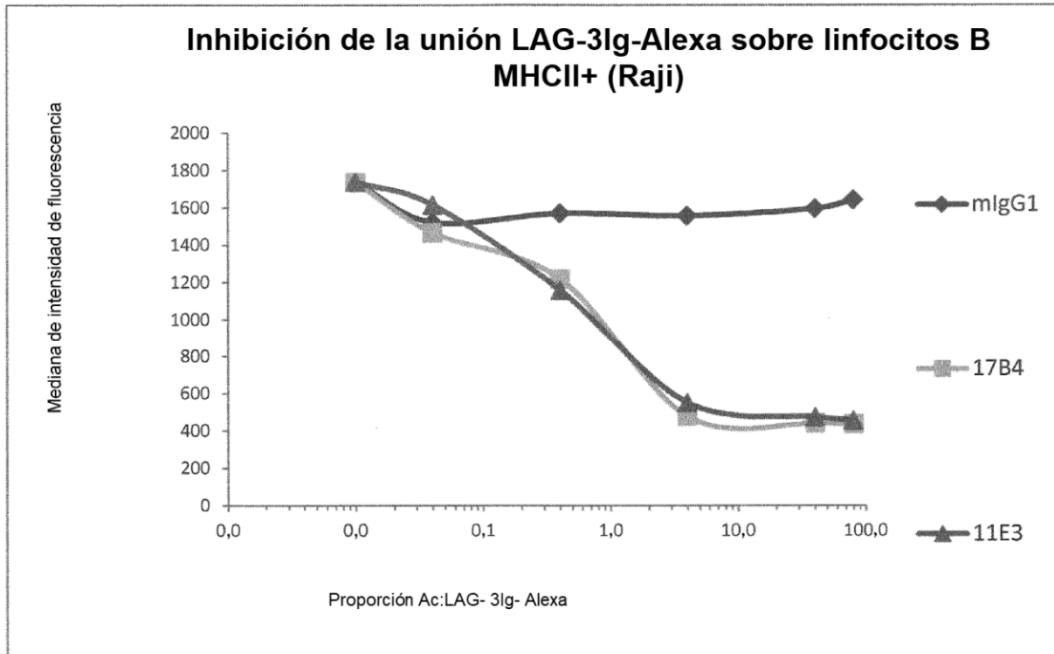


Figure 7



Fondo promedio (sin LAG- 3Ig- Alexa488):

405 ± 23;

Promedio sin anticuerpo:

1738 ± 164

Figura 8

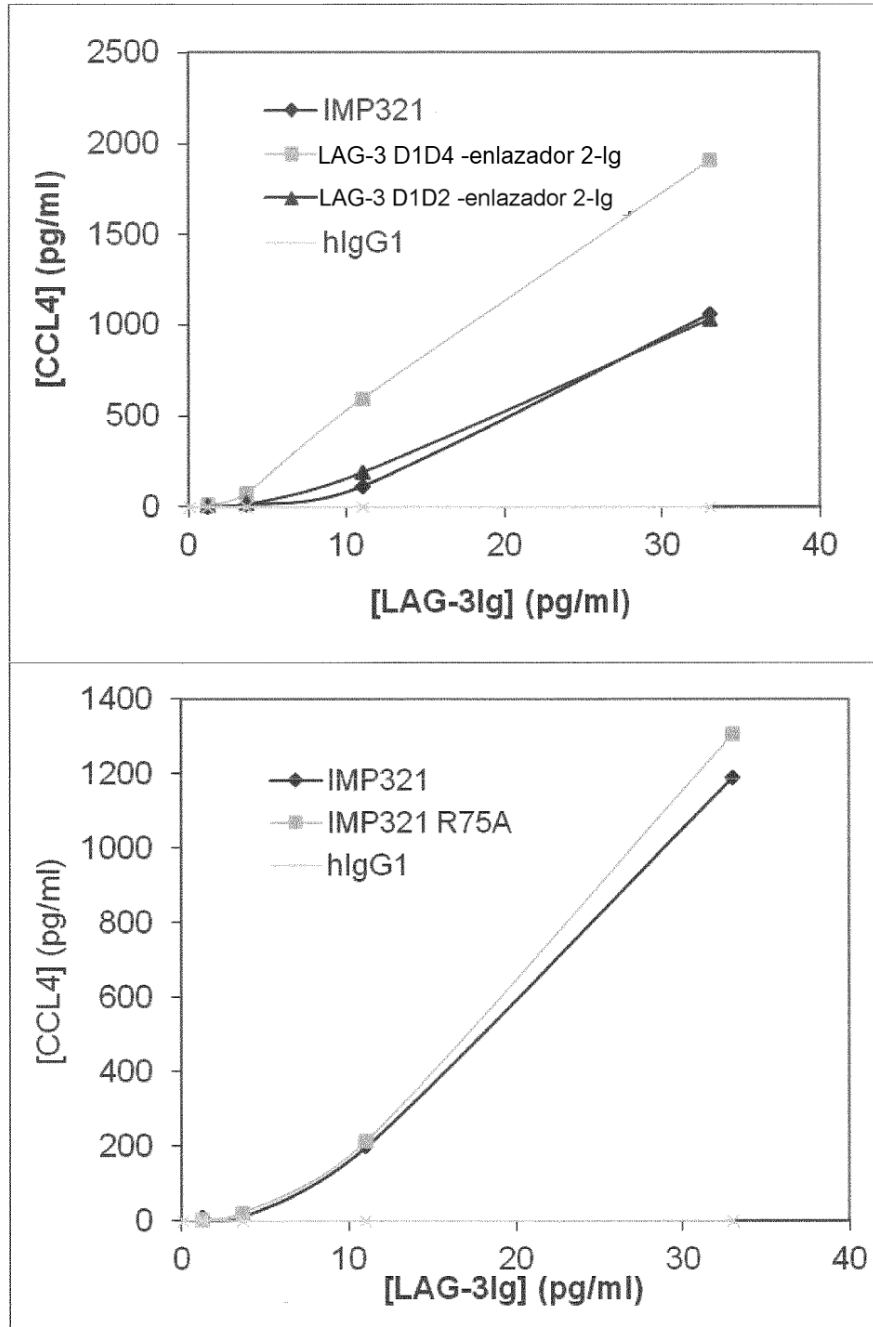


Figura 9

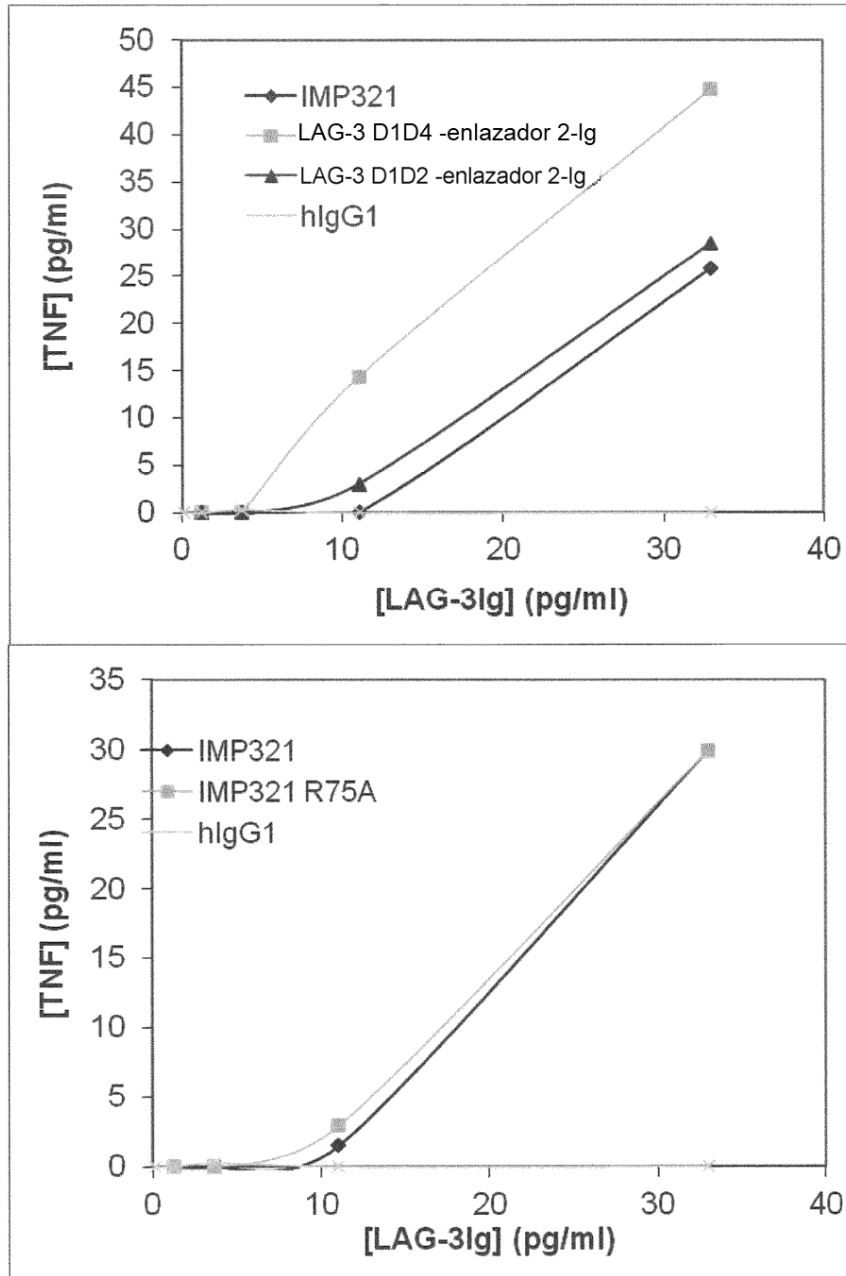


Figura 10

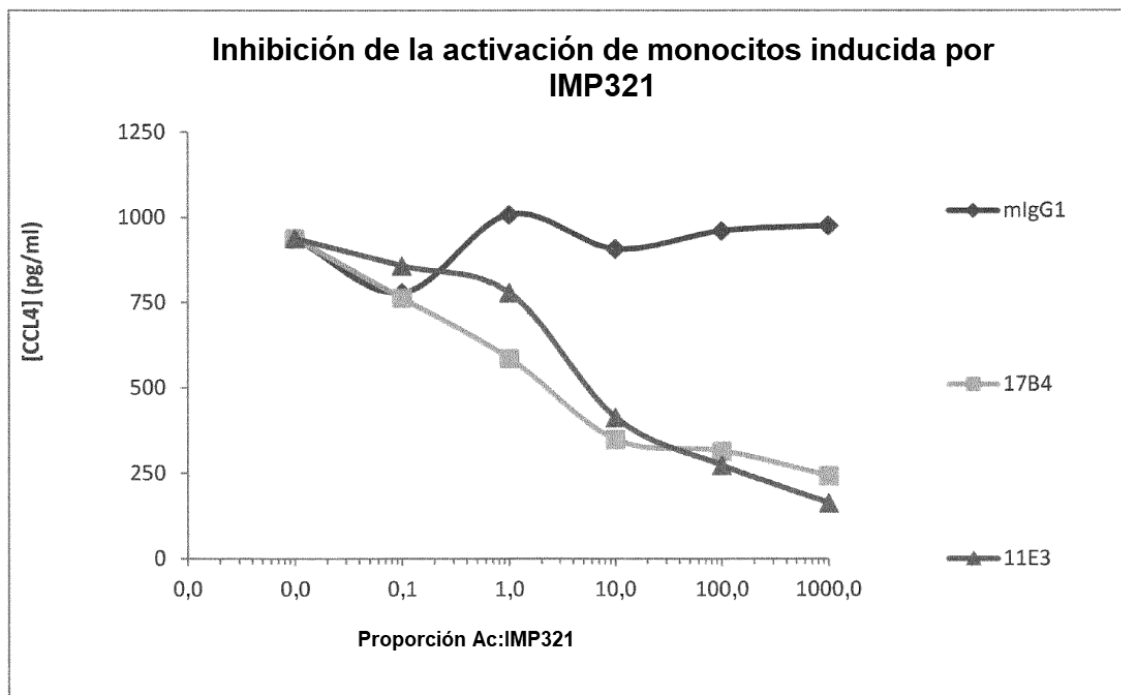
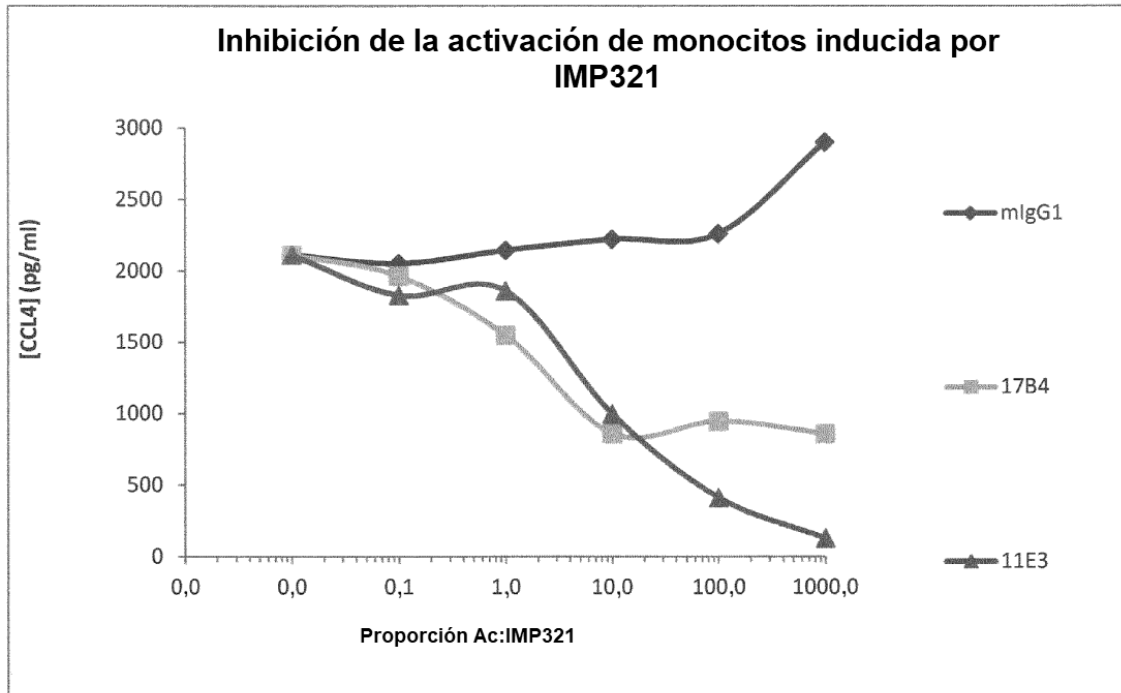


Figura 11

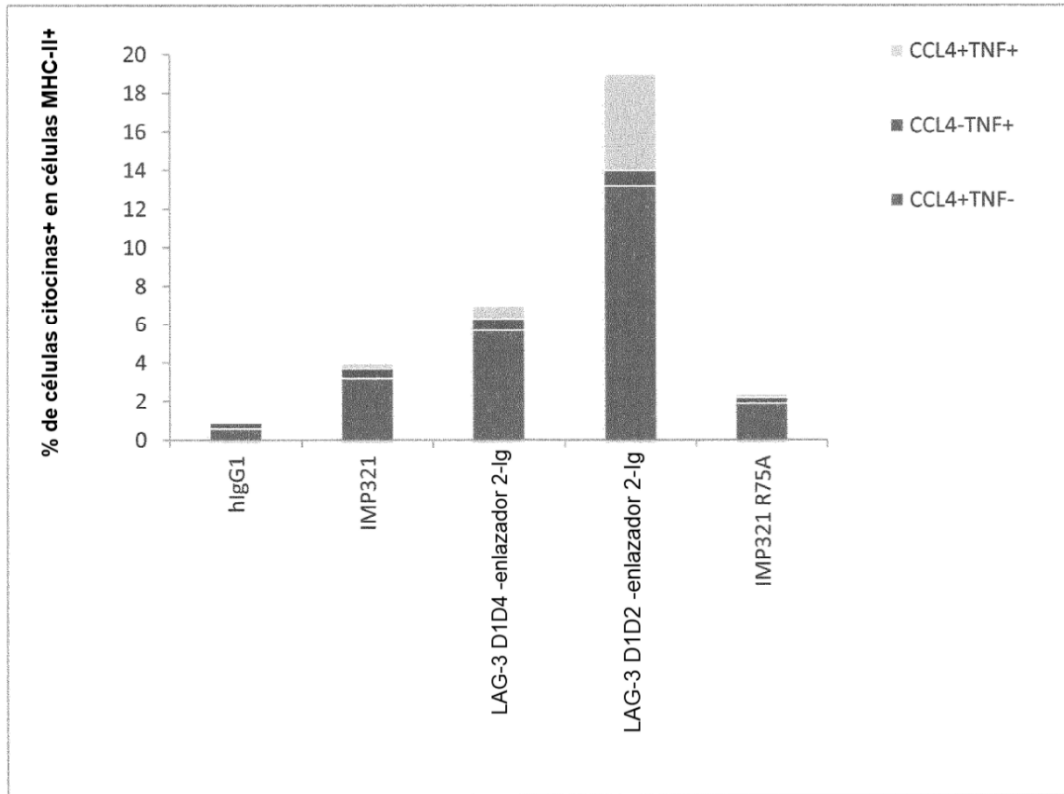
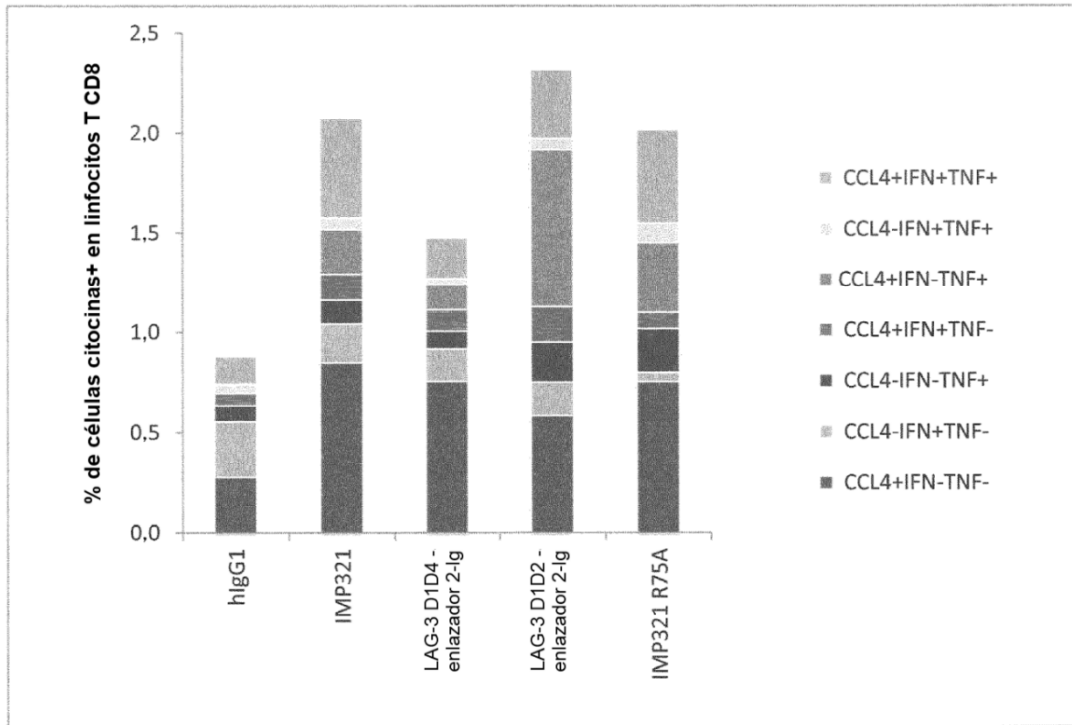


Figura 12



ES 2 730 976 T3

Figura 13

10 20 30 40 50 60
LQPGAIEVPVV WAQEGAPAQL PCSPTIPLQD LSLRRRAGVT WQHQPDSGPP AAAPGHPLAP

70 80 90 100 110 120
GHPAAPSSW GPRPRRYTVL SVGPGGLRSG RLPLQPRVQL DERGRQRGDF SLWLRPARRA

130 140 150 160 170 180
DAGEYRAAVH LRDRALSCRL RLRLGQASMT ASPPGSLRAS DWVILNCSFS RPDRPASVHW

190 200 210 220 230 240
FRNRGQGRVP VRESPPHHLA ESFLFLPQVS PMDSGPWGCI LTYRDGFNVS IMYNLTVLGL

250 260 270 280 290 300
EPPTPLTVYA GAGSRVGLPC RLPAGVGTRS FLTAKWTPPG GGPDLLVTGD NGDFTLRLED

310 320 330 340 350 360
VSQAQAGTYT CHIHLEQQQL NATVTLAIIT VTPKSFGSPG SLGKLLCEVT PVSGQERFVW

370 380 390 400 410 420
SSLDTPSQRS FSGPWLEAQE AQLLSQPWQC QLYQGERLLG AAVYFTELSS PGAQRSGRAP

430 440 450 460 470 480
GALPAGHLLL FLTLGVLSLL LLVTGAFGFH LWRRQWRPRR FSALEQGIHP QAQSKIEELE

490 500
QEPEPEPEPE PEPEPEPEPE QL