

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 700**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2008 E 12196316 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2601962**

54 Título: **Régimen de dosificación de LAG-3 para su uso en el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

05.10.2007 EP 07291214

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

26.02.2020

73 Titular/es:

**IMMUTEP (100.0%)
Parc Club Orsay 2, Rue Jean Rostand
91400 Orsay, FR**

72 Inventor/es:

TRIEBEL, FRÉDÉRIC

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 744 700 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

Régimen de dosificación de LAG-3 para su uso en el tratamiento de cáncer

5 Campo técnico

La presente invención se define en las reivindicaciones 1-3 y se refiere al uso de LAG-3 recombinante o derivados de la misma con el fin de provocar una respuesta inmunitaria mediada por monocitos.

10 Permite un aumento del número de monocitos en la sangre.

Encuentra muchas aplicaciones, en particular en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos en la inmunoterapia del cáncer.

15 En la siguiente descripción, las referencias entre corchetes [] se refieren a la lista de referencias adjunta.

Estado de la técnica

20 El gen 3 (*hlag-3*) de activación de los linfocitos que se expresa en los linfocitos T activados humanos CD4⁺ y CD8⁺, así como en los linfocitos NK activados, codifica una proteína de membrana de tipo I (LAG-3) de 503 aminoácidos con cuatro dominios (IgSF) de la superfamilia de las inmunoglobulinas extracelulares [1]. Se clonó un gen 3 (*mlag-3*) de activación de linfocitos murinos y se observó aproximativamente un 70 % de homología con el gen *hlag-3*, con el mismo motivo rico en prolina en la cola intracitoplasmática.

25 Se sabe que LAG-3 (CD223), que se describe como un ligando natural de alta afinidad por el MHC de clase II, induce *in vitro* la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos y que se utiliza como un coadyuvante en la inmunoterapia para inducir respuestas de los linfocitos T colaboradores CD4 de tipo 1 y respuestas de los linfocitos T CD8 *in vivo* [2]. Para más información respecto a LAG-3 y a su uso como inmunoestimulante consultar TRIEBEL et al. [1], TRIEBEL et al. [3] y HUARD et al. [4].

30 Algunas formas solubles de LAG-3 pueden unirse a las moléculas del MHC de clase II y pueden inducir la maduración y migración de las células dendríticas hacia los órganos linfoides secundarios donde pueden sensibilizar a los linfocitos T colaboradores CD4 indiferenciados y a los linfocitos T citotóxicos CD8, lo que conduce al rechazo del tumor [5].

35 Más recientemente se demostró que una proteína de fusión LAG-3Ig recombinante humana soluble (IMP321) activaba una amplia gama de células efectoras en respuestas inmunitarias tanto innatas como adquiridas, por ejemplo, induciendo a los monocitos-macrófagos a secretar citocinas/quimiocinas [6].

40 Los monocitos se producen en la médula ósea a partir de los precursores de células madre hematopoyéticas llamadas monoblastos. Éstos constituyen entre el tres y el ocho por ciento de los leucocitos en la sangre. Los monocitos circulan en la corriente sanguínea durante aproximadamente 24 horas (semivida de 8 horas) y a continuación, normalmente se trasladan a los tejidos de todo el cuerpo. En los tejidos, los monocitos maduran a macrófagos, células epitelioides o células presentadoras de antígeno (APC, por ejemplo células dendríticas). Los monocitos son responsables de la fagocitosis (ingestión) de sustancias extrañas en el cuerpo. Los monocitos pueden realizar fagocitosis utilizando proteínas intermediarias (opsonización) tales como anticuerpos o complemento que recubren al patógeno, así como por medio de la unión al patógeno directamente a través de receptores de reconocimiento de patrones que reconocen los patógenos. Los monocitos son también capaces de destruir a las células hospedadoras infectadas a través de anticuerpos, lo que se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Debido a su secreción y a las propiedades de la fagocitosis, en una respuesta inmunitaria inespecífica y específica se producen monocitos-macrófagos.

50 El estudio de marcadores de membrana permite la identificación de las poblaciones de monocitos, maduros o no, distróficos o no. Las moléculas presentes en las membranas de los monocitos, maduros o no, casi siempre son inespecíficas, pero corresponden a las actividades siguientes:

- receptor para el fragmento Fc de la IgG (CD16, CD32, CD64),
- receptor para el fragmento Fc de la IgE (CD23),
- receptor de fracciones del complemento (CD11b, CD21/CD35),
- 60 - proteínas de adhesión de leucocitos (CD11a, CD11c),
- proteína que facilita la unión a LPS de las bacterias Gram- (CD14),
- proteína con actividad de tirosina fosfatasa (CD45).

Divulgación de la invención

65 Actualmente los autores de la presente invención han descubierto, de forma completamente inesperada, que cuando

la LAG-3 humana o derivados de la misma, se inocular en pacientes con tumores altamente neoplásicos, por ejemplo pacientes con cáncer de mama metastásico (MBC) o carcinoma metastásico de células renales claras (MRCC), induce una inmunidad potente que es dependiente de los monocitos.

- 5 Dicha inmunidad inducida se manifiesta en sí misma por un incremento significativo en el recuento de los monocitos en sangre.

Este resultado se consiguió por medio de una administración plural de LAG-3 o derivados de la misma a los pacientes que reciben inmunoterapia o quimio-inmunoterapia.

- 10 Este resultado es bastante sorprendente, ya que no se espera que la unión y la activación de los monocitos vayan seguidas de una expansión de los monocitos. De hecho, los monocitos son el final de la diferenciación de las células hematopoyéticas y no pueden proliferar. Pueden permanecer en la sangre como monocitos o diferenciarse en macrófagos o en células dendríticas bajo la influencia de diferentes citocinas, hasta que mueren. Por consiguiente se cree, sin limitarse a la siguiente teoría, que el mecanismo de acción implicado puede ser una señal proliferativa dirigida a las células precursoras hematopoyéticas (antes de la etapa de promonocito) que residen en la médula ósea, o un incremento en la semivida o en el tiempo de residencia de los monocitos circulantes maduros.
- 15

- 20 Por lo tanto, la presente invención se refiere a una proteína LAG-3 recombinante o a un derivado de la misma que provoca una respuesta inmunitaria mediada por monocitos, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante la administración de una pluralidad efectiva de dosis de la proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma, donde cada dosis de la proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma está en un intervalo de 6-30 mg..

- 25 Por "derivados de LAG-3" en el sentido de la presente invención, se entiende mutantes y fragmentos de LAG-3, siempre que mantengan la capacidad de LAG-3 para unirse a las moléculas del MHC de clase II.

Por tanto, pueden usarse las siguientes formas de LAG-3:

- 30 - la proteína LAG-3 completa,
 - un fragmento de polipéptido soluble de la misma que consiste en al menos uno de los cuatro dominios extracelulares de la inmunoglobulina, concretamente la parte soluble de LAG-3 que comprende la región extracelular que se extiende desde el aminoácido 23 hasta el aminoácido 448 de la secuencia de LAG-3 divulgada en la solicitud de patente francesa FR 2 656 800,
- 35 - un fragmento de LAG-3 que consiste sustancialmente en todo el primer y segundo dominios,
 - un fragmento de LAG-3 que consiste sustancialmente en todo el primer y segundo dominios o los cuatro dominios, tal como se define en el documento WO 95/30750,
 - una forma mutante de LAG-3 soluble o un fragmento de la misma que comprende los dominios extracelulares D1 y D2 y que consiste en:

- 40 * una sustitución de un aminoácido en una de las siguientes posiciones:

- 45 posición 73 donde ARG está sustituido por GLU,
 posición 75 donde ARG está sustituido por ALA o GLU,
 posición 76 donde ARG está sustituido por GLU,
 o una combinación de dos o más de dichas sustituciones,

- * una sustitución de un aminoácido en una de las siguientes posiciones:

- 50 posición 30 donde ASP está sustituido por ALA,
 posición 56 donde HIS está sustituido por ALA,
 posición 77 donde TYR está sustituido por PHE,
 posición 88 donde ARG está sustituido por ALA,
 posición 103 donde ARG está sustituido por ALA,
 55 posición 109 donde ASP está sustituido por GLU,
 posición 115 donde ARG está sustituido por ALA,
 o una delección de la región comprendida entre la posición 54 y la posición 66,
 o una combinación de dos o más de dichas sustituciones.

- 60 Esos mutantes se describen por HUARD et al. (Proc Natl Acad Sci USA, 11: 5744-5749, 1997).

- una variante fisiológica de LAG-3 comprendida por la proteína de 52 kDa soluble que contiene D1, D2 y D3.
 - una proteína de fusión 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 con el Fc de la IgG1 humana.
- 65

- 5 Por "pluralidad eficaz de dosis de una proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma", en el sentido de la presente invención, se entiende una formulación que permite la administración de una dosis de una proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma cada semana o varias semanas durante al menos 12 semanas, y preferentemente durante al menos 24 semanas, separadas por intervalos sin administración de 13 días \pm 2 días. Ventajosamente, la administración es un horario cada dos semanas.
- 10 Por "una dosis de una proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma", en el sentido de la presente invención, se entiende una formulación que permite una administración en el intervalo de 6-30 mg de proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma a un paciente en necesidad de la misma que tiene un índice de masa corporal (peso/altura²) en el intervalo de 18-30 kg/m².
- 15 La LAG-3 recombinante o derivados de la misma se administran en una forma libre, por ejemplo en una forma soluble mediante la inoculación de estos de forma sistémica, por ejemplo, como inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, preferentemente en forma de una inyección subcutánea.
- Dicha LAG-3 recombinante o derivados de la misma se formulan con el fin de permitir la administración con un compuesto que tenga propiedades inmunoterapéuticas o quimioterapéuticas contra el cáncer.
- 20 Por "administración con un compuesto", se entiende una administración de una LAG-3 recombinante o un derivado de la misma antes de, con, o posteriormente a, la administración de dicho compuesto.
- 25 Por "compuesto que tiene propiedades quimioterapéuticas contra el cáncer" se entiende, por ejemplo, un agente quimioterapéutico seleccionado del grupo que consiste en taxanos (paclitaxel, docetaxel), gemcitabina y antraciclinas (doxorubicina).
- En un aspecto particular, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma se administra a los pacientes después de la primera administración del compuesto citotóxico que tiene propiedades quimioterapéuticas contra el cáncer.
- 30 Ventajosamente, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma se administra a los pacientes de 12 a 96 horas después de la administración del compuesto citotóxico que tiene propiedades contra el cáncer.
- 35 En otro aspecto, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma se administra a los pacientes uno o dos días después de la primera administración del compuesto que tiene propiedades quimioterapéuticas contra el cáncer.
- 40 En otro aspecto particular, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y el compuesto citotóxico que tiene propiedades quimioterapéuticas contra el cáncer se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.
- Ventajosamente, en este aspecto de la divulgación, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma se administra al menos seis veces, por ejemplo siete veces, diez veces, doce veces o más.
- 45 Ventajosamente, en este aspecto particular de la divulgación, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma se administra en un horario cada dos semanas.
- Ventajosamente, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma se administra a una dosis comprendida entre 6 y 30 mg, eventualmente a una dosis comprendida entre 8 y 25 mg, eventualmente entre 12 y 20 mg.
- 50 Por "compuesto que tiene propiedades inmunoterapéuticas contra el cáncer", también se entiende, por ejemplo, un compuesto seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos terapéuticos que destruyen células tumorales a través de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y mezclas de los mismos, y preferentemente del grupo que consiste en rituximab, cetuximab, edrecolomab y trastuzumab.
- 55 En un aspecto particular, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y los anticuerpos terapéuticos se administran a los pacientes simultáneamente, por separado o secuencialmente.
- Ventajosamente, en un aspecto particular, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma se administra a los pacientes el mismo día que los anticuerpos terapéuticos.
- 60 Se describe un kit de partes, es decir, una preparación combinada, que contiene la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y un anticuerpo terapéutico para su uso simultáneo, por separado o secuencial.
- 65 Ventajosamente, el kit de partes contiene la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y un anticuerpo terapéutico seleccionado del grupo que consiste en rituximab, cetuximab, edrecolomab y trastuzumab.

Preferencialmente, el kit de partes contiene la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y rituximab.

En el kit de partes, la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y un anticuerpo terapéutico forman una unidad funcional, debido a un efecto citotóxico sinérgico entre los dos componentes. Este efecto es un nuevo efecto de unión, debido a que los dos componentes administrados solos no tienen el mismo efecto que cuando se administran como una preparación combinada.

También se describe un kit de partes, es decir, una preparación combinada, que contiene proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y un compuesto que tiene propiedades quimioterapéuticas contra el cáncer para su uso simultáneo, por separado o secuencial.

Ventajosamente, el kit de partes contiene la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y un compuesto que tiene propiedades quimioterapéuticas contra el cáncer seleccionado del grupo que consiste en taxanos (paclitaxel, docetaxel), gemcitabina y antraciclinas (doxorubicina)

La presente divulgación también describe un método para tratar una afección patológica que implica una respuesta inmunitaria mediada por monocitos, que comprende administrar el medicamento como se ha definido anteriormente a un paciente en necesidad del mismo.

Por "afección patológica que implica una respuesta inmunitaria mediada por monocitos", en el sentido de la presente invención, se entiende cáncer.

En los siguientes párrafos numerados se definen varios aspectos.

1. Uso de una proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma que provoca una respuesta inmunitaria mediada por monocitos, para la fabricación de un medicamento que induce un aumento en el número de monocitos para el tratamiento del cáncer, donde el medicamento consiste en una pluralidad efectiva de dosis de una proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma, donde cada dosis de la proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma está en el intervalo de 6-30 mg.

2. Uso de acuerdo con el párrafo 1, donde dicha pluralidad de dosis de una proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma se formula con el fin de permitir la administración de una dosis cada semana a varias semanas durante al menos 12 semanas, y preferentemente durante al menos 24 semanas, separadas por intervalos sin administración de 13 ± 2 días.

3. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 o 2, donde dicha una dosis de una proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma se formula de manera que permita la administración subcutánea o intravenosa en el intervalo de 6-30 mg de una proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma a un paciente en necesidad de la misma que tiene un índice de masa corporal (peso/altura²) en el intervalo de 18-30 kg/m².

4. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 3, donde dichas dosis de una proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma se formulan para permitir la administración con un compuesto que tiene propiedades inmunoterapéuticas o quimioterapéuticas contra el cáncer.

5. Uso de acuerdo con el párrafo 4, donde una dosis de una proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma comprende 6-30 mg de dicha proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma.

6. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 4 o 5, donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos.

7. Uso de acuerdo con el párrafo 6, donde dichos agentes quimioterapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en taxanos, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel, y antraciclinas, por ejemplo doxorubicina y gemcitabina.

8. Uso de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 4 o 5, donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos terapéuticos que destruyen células tumorales a través de ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y mezclas de los mismos.

9. Uso de acuerdo con el párrafo 8, donde dichos anticuerpos terapéuticos son del grupo que consiste en rituximab, cetuximab, edrecolomab y trastuzumab.

10. Kit de partes que contiene la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y un anticuerpo terapéutico como se menciona en los párrafos 8 o 9, para su uso simultáneo, por separado o secuencial.

11. Kit de partes que contiene la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma y un compuesto que tiene propiedades quimioterapéuticas contra el cáncer como se menciona en los párrafos 6 o 7, para su uso simultáneo, por separado o secuencial.

Otras ventajas también pueden ser evidentes para un experto en la materia a partir de los ejemplos no limitativos ofrecidos a continuación, e ilustrados por las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 representa el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de monocitos (es decir linfocitos CD14⁺CD45⁺) en CMSP de pacientes con carcinoma de mama metastásico.
- La Figura 2 representa el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de monocitos

(es decir linfocitos CD14⁺CD45⁺) en sangre completa fresca de pacientes con carcinoma de mama metastásico.

- La Figura 3 representa el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de monocitos (es decir linfocitos CD14⁺CD45⁺) en sangre completa fresca de pacientes con cáncer de células renales metastásico.
- 5 - La Figura 4 representa el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de monocitos (es decir linfocitos CD14⁺CD45⁺) en sangre completa fresca de pacientes con carcinoma de mama metastásico.
- La figura 5 representa los perfiles farmacocinéticos de IMP321 medidos por ELISA en el plasma de pacientes con cáncer de células renales metastásico.
- 10 - La Figura 6 representa el análisis de citometría de flujo de CMSP cultivadas en diferentes condiciones con rituximab y/o IMP321.

Ejemplos

15 **Ejemplo 1 (no forma una realización de la invención): Aumento de monocitos en pacientes con cáncer de mama metastásico (MBC) usando dosis bajas de IMP321**

Cada uno de los cinco pacientes con MBC, que recibían quimioterapia que se sabe que induce la apoptosis de células tumorales, recibió una dosis subcutánea de IMP321 de 0,25 mg 1-2 días después de la quimioterapia cada dos semanas, durante 24 semanas, separadas por intervalos sin administración de 14 días.

20 Se recogieron muestras de sangre en tubos de litio heparinizados (Vacutainer; BD Biosciences) de cada paciente, 14 días después de la última inyección de IMP321 (es decir, con el objetivo de determinar los efectos inmunomoduladores duraderos del producto), a los 3 meses (día 85) y a los 6 meses (día 170). Las CMSP fueron aisladas en gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia) usando tubos Leucosep (Greiner Bio-One), y se utilizaron inmediatamente.

El aumento del número de monocitos se analizó por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) en dichas muestras de CMSP frescas (porque los monocitos son sensibles a la congelación), y se comparó con los recuentos de monocitos efectuados en muestras de CMSP frescas recogidas antes de la administración IMP321 (Día 1).

Los resultados se representan en la Figura 1.

35 Los resultados mostraron aumento medio de 2,5 veces (a los 3 meses, Día 85) y de 3,5 veces (a los 6 meses, Día 170) de los recuentos de monocitos en este protocolo clínico de dosis baja de IMP321.

Con el fin de confirmar los resultados anteriores, se llevó a cabo un enfoque más directo y probablemente más preciso, que fue cuantificar directamente *ex-vivo* el número de monocitos en sangre completa (es decir, sin purificación previa de CMSP en gradiente de Ficoll) midiendo primero el volumen exacto de sangre a analizar con perlas fluorescentes diluidas y después contando el número de linfocitos CD14⁺ (es decir, monocitos) en los linfocitos CD45⁺ acotados (leucocitos) presentes en este volumen de sangre completa.

Los resultados se representan en la Figura 2.

45 Los resultados mostraron un aumento medio de 4,4 veces en el Día 170 (2,8 veces en el Día 85) cuando IMP321 se administraba en dosis bajas (0,25 mg) durante un largo periodo de tiempo, 6 meses, con 12 inyecciones, lo que demuestra una estimulación fuerte y directa de las células hematopoyéticas análogas a los monocitos de clase MHC II⁺ diana.

50 **Ejemplo 2: Aumento de monocitos en pacientes con carcinoma metastásico de células renales claras (MRCC) usando altas dosis de IMP321**

Cada uno de los tres pacientes con MRCC recibió una dosis subcutánea de IMP321 de 6,25 mg cada dos semanas, durante 12 semanas, separadas por intervalos sin administración de 14 días.

55 Se recogieron muestras de sangre como se describió anteriormente de cada paciente, 14 días después de la última inyección de IMP321 (es decir, con el objetivo de determinar los efectos inmunomoduladores duraderos del producto), a los 2 meses (día 57) y 3 meses (día 85), y se utilizaron inmediatamente.

60 La expansión de linfocitos CD14⁺ CD45⁺ se analizó por FACS en muestras de sangre fresca (porque los monocitos son sensibles a la congelación), y se compararon con los recuentos de monocitos efectuados en muestras de sangre fresca recogidas antes de la administración de IMP321 (Día 1).

Los resultados se representan en la Figura 3.

65 Los resultados mostraron un aumento medio de 2 veces (a los 3 meses, Día 85) de los recuentos de monocitos con

este protocolo clínico de dosis alta de IMP321 donde los pacientes sólo recibieron 6 inyecciones.

Ejemplo 3: Aumento de monocitos en pacientes con carcinoma de mama metastásico que reciben dosis de paclitaxel y de IMP321

5 Los pacientes que reciben como una primera línea de quimioterapia para el carcinoma de mama metastásico, 6 ciclos de paclitaxel (80 mg/m² administrados i.v.) los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días, recibieron 1-30 mg s.c. (vía subcutánea) de IMP321 los días 2 y 16 de cada ciclo de 28 días. O bien, IMP321 se administra los días 3 o 17.

10 Por consiguiente, cada paciente recibió un ciclo estándar de 6 meses de paclitaxel semanal con 12 inyecciones s.c. de IMP321, administrándose cada inyección uno a dos días después de la administración de paclitaxel en un horario cada dos semanas.

15 El aumento en el recuento de monocitos absolutos por microlitro de sangre fresca se analizó mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), 14 días después de la última inyección, a los 3 meses (Día 85) y a los 6 meses (Día 170) en comparación con el día 1.

20 Los resultados obtenidos en los pacientes inyectados con una dosis baja de IMP321 (1,25 mg) se representan en la Figura 4.

Estos datos mostraron que las dosis de 1,25 mg en la mayoría de los pacientes, si no en todos (Figura 4), inducen una expansión del grupo del subconjunto de monocitos en la sangre.

25 Se predice que el régimen posológico óptimo para IMP321 será de entre 6 y 30 mg/inyección.

Estas dosis han demostrado ser seguras y proporcionar una exposición sistémica aceptable en base a los resultados de los datos farmacocinéticos obtenidos en pacientes con cáncer metastásico de células renales claras (Figura 5). Podría obtenerse una concentración en sangre de IMP321 superior a 1 ng/ml durante al menos 24 horas después de la inyección s.c. en pacientes inyectados con dosis de IMP321 de más de 6 mg (Figura 5).

Ejemplo 4: Tratamiento de pacientes con cáncer de páncreas avanzado que reciben dosis de gemcitabina e IMP321

35 Los pacientes, que reciben como una primera línea de quimioterapia para el cáncer de páncreas avanzado (o pacientes no elegibles para la extirpación quirúrgica del tumor) 6 ciclos de gemcitabina estándar (1 gm/m² administrada por vía i.v. durante 30 min) los días 1, 8 y 15 de un ciclo de 28 días, reciben además de 6 a 30 mg de IMP321 s.c. los días 2 y 16 de cada ciclo de 28 días. O bien, IMP321 se administra los días 3 o 17.

40 Por consiguiente, cada paciente recibe un ciclo estándar de 6 meses de gemcitabina con 12 inyecciones s.c. de IMP321, administrándose cada inyección uno a dos días después de la administración de gemcitabina en un horario cada dos semanas.

45 El número de monocitos se analiza mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) como en el ejemplo 1.

Ejemplo 5: (no forma una realización de la invención): Inducción de ADCC mediada por rituximab aumentada por dosis bajas de IMP321

50 Las CMSP se incuban en primer lugar durante 40 horas con IL-2 (100 U/ml), con o sin IMP321 (a las concentraciones 0 µg/ml, 0,03 µg/ml o 0,1 µg/ml). Las CMSP se incuban después con concentraciones en aumento de rituximab (0, 0,5 y 5 µg/ml) en presencia de células diana (es decir, células Raji B CD20⁺ humanas).

55 Las células Raji se marcaron en primer lugar con CFSE (éster succinimidílico de carboxifluoresceína), se incubaron en medio con rituximab a 0, 0,5 o 5 µg/ml y se co-cultivaron con células efectoras a una relación efector-diana de 25:1 durante 6 horas a 37 °C.

60 Las células se incubaron después con 7-AAD (7-amino-actinomicina-D) durante 15 minutos en hielo y se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células diana Raji CFSE⁺ 7-AAD⁺ muertas (es decir, el % de citotoxicidad).

Los resultados se presentan en la Figura 6.

65 El aumento de la concentración de rituximab aumentó el porcentaje de citotoxicidad, mostrando claramente una actividad ADCC dependiente de la dosis.

Cuando se añaden 0,03 o 0,1 µg/ml de IMP321, el porcentaje de citotoxicidad aumentó en gran medida. Por

ejemplo, se observa un 30 % de citotoxicidad con 0,5 µg/ml de rituximab en presencia de 0,1 µg/ml de IMP321 que es superior al valor del 25 % de citotoxicidad obtenido con 5 µg/ml de rituximab en ausencia de IMP321.

5 De esta manera, la adición de 0,1 µg/ml de IMP321 potencia 10-15 veces la actividad de rituximab debido a que se obtiene una citotoxicidad superior con 10 veces menos de anticuerpo cuando se añade una dosis baja de IMP321 (0,1 µg/ml).

Estos datos muestran el efecto sinérgico entre rituximab e IMP321.

10 **Lista de referencias**

- [1] TRIEBEL et al., J. Exp. Med., 171: 1393-1405, 1990
- [2] BRIGNONE et al., J. Immune Based Ther Immunotherapies, 5: 5, 2007
- [3] TRIEBEL et al., Trends Immunol., 24: 619-622, 2003
- 15 [4] HUARD et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 5744-5749, 1997
- [5] PRIGENT et al., Eur. J. Immunol., 29: 3867-3876, 1999
- [6] BRIGNONE et al., J. Immunol., 179: 4202-4211, 2007

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína LAG-3 recombinante, o un derivado de la misma, que es un mutante o fragmento de LAG-3 que mantiene la capacidad de LAG-3 para unirse a moléculas del MHC de clase II, que provoca una respuesta inmunitaria mediada por monocitos, para su uso en el tratamiento del cáncer mediante la administración de una pluralidad eficaz de dosis de la proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma, donde cada dosis de la proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma está en el intervalo de 6-30 mg.
- 10 2. Proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma, para su uso según la reivindicación 1, donde dicha pluralidad de dosis de una proteína LAG-3 recombinante o de un derivado de la misma, se debe administrar de la siguiente manera: una dosis cada semana a varias semanas durante al menos 12 semanas, y preferentemente durante al menos 24 semanas, separadas por intervalos sin administración de 13 ± 2 días.
- 15 3. Proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma, para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde la proteína LAG-3 recombinante o un derivado de la misma se debe administrar sistémicamente, preferentemente como una inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa.

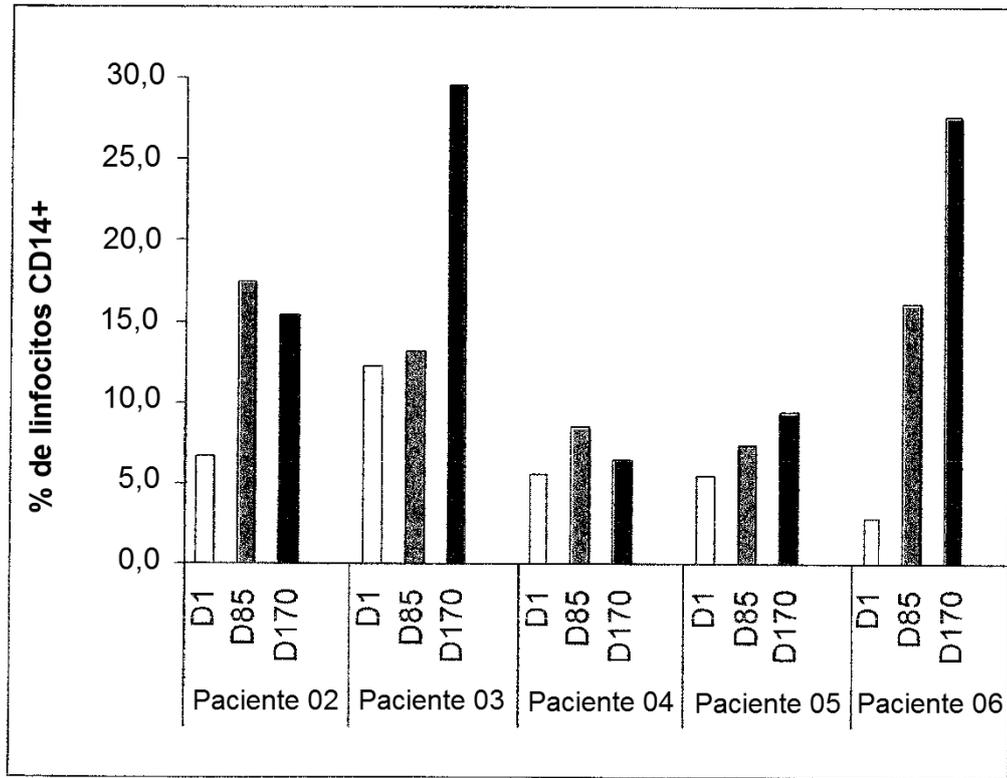


Figura 1

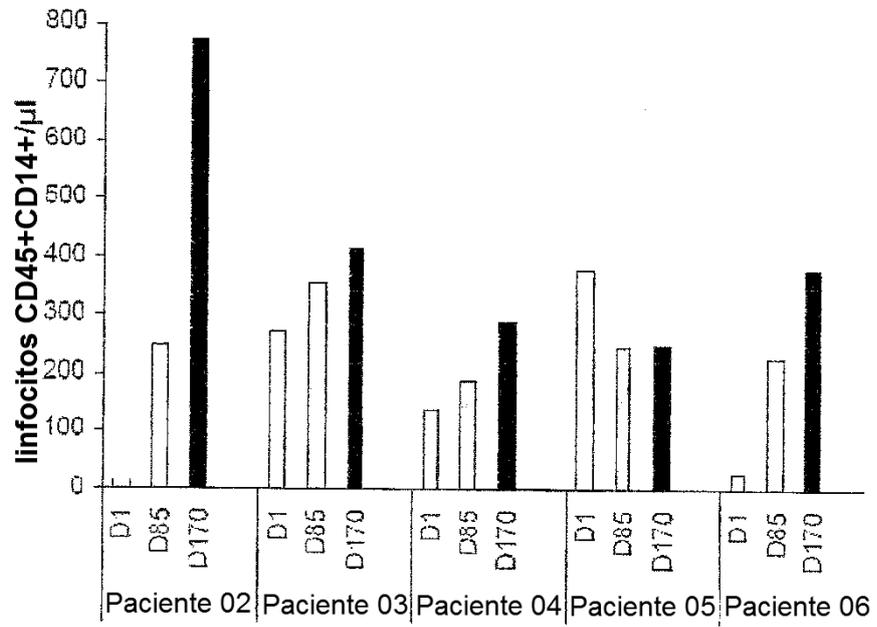


Figura 2

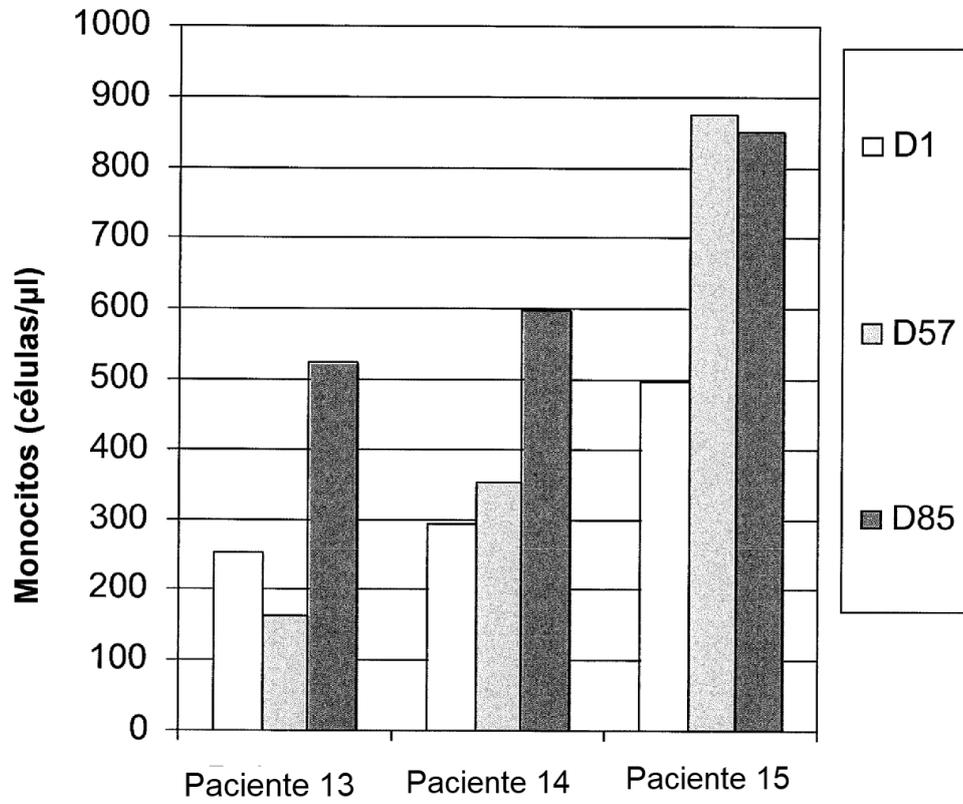


Figura 3

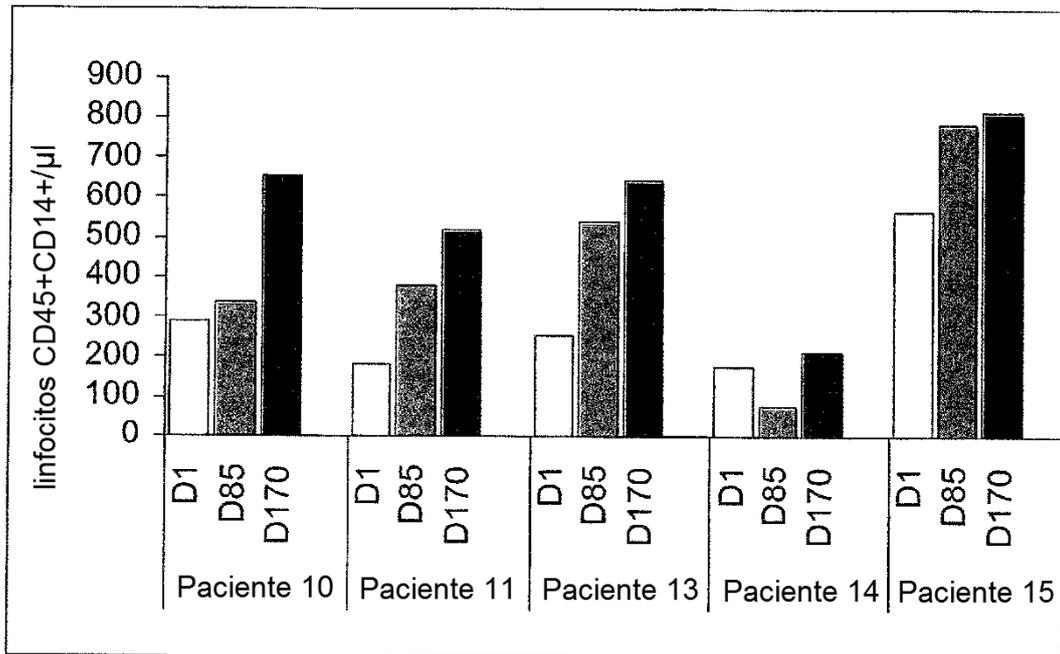


Figura 4

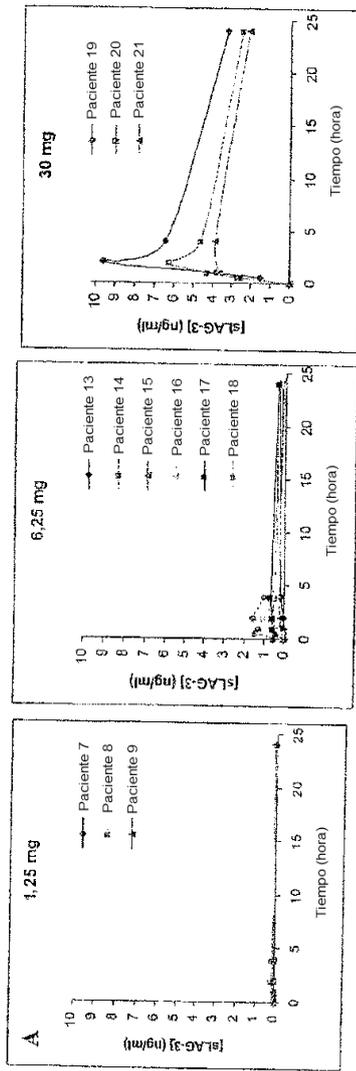


Figura 5

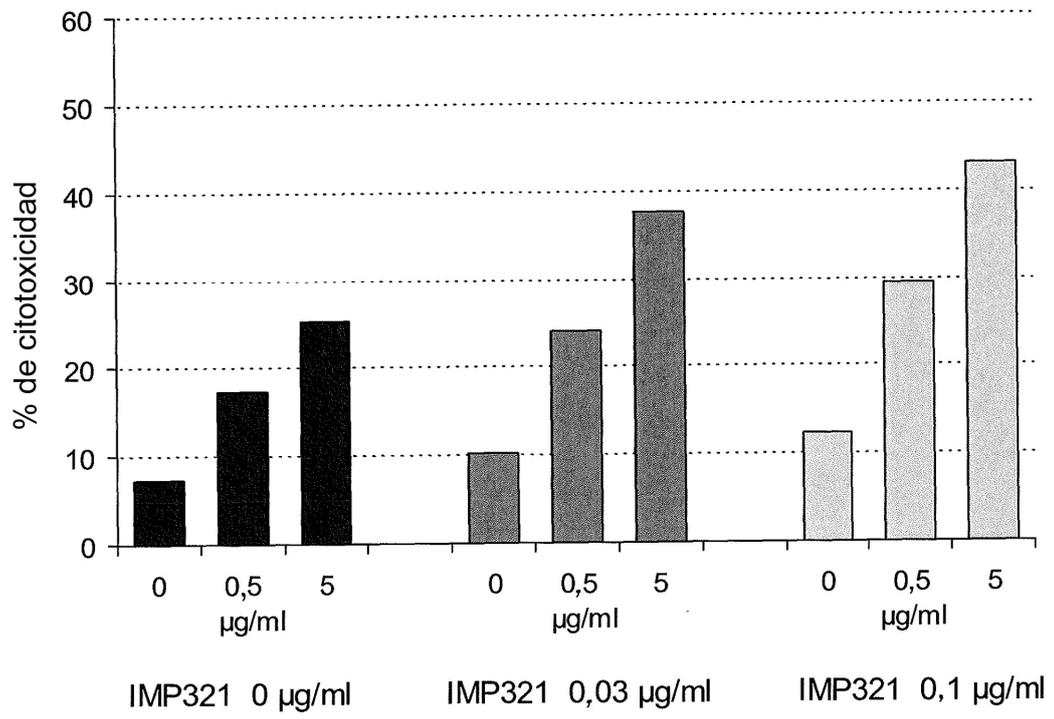


Figura 6