

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 921**

51 Int. Cl.:

A01N 43/04 (2006.01)

C07H 15/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2013 PCT/US2013/060182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14043708**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2013 E 13837458 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2900061**

54 Título: **Método para mejorar las inmunoterapias específicas en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

17.09.2012 US 201261701914 P

25.01.2013 US 201361756818 P

01.02.2013 US 201361759532 P

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

15.07.2020

73 Titular/es:

**GALECTIN THERAPEUTICS INC. (50.0%)
4960 Peachtree Industrial Blvd., Suite 240
Norcross, GA 30071, US y**

**PROVIDENCE HEALTH & SERVICES OREGON
D/B/A EARLE A. CHILES RESEARCH INSTITUTE
OF THE ROBERT W. FRANZ CANCER RES.
CENT. AT PROVIDENCE PORT. MED. CEN.
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**TRABER, PETER, G.;
REDMOND, WILLIAM, L.;
ZOMER, ELIEZER;
KLYOSOV, ANATOLE y
LINCH, STEFANIE, N.**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 773 921 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

Método para mejorar las inmunoterapias específicas en el tratamiento del cáncer

5 Datos de solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos de América Núm. 61/701,914, presentada el 17 de septiembre de 2012, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos de América Núm. 61/756,818, presentada el 25 de enero de 2013, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos de América Núm. 61/759,532, presentada el 1 de febrero de 2013.

10

Campo de la invención

15

Los métodos y composiciones de la invención se refieren a la mejora de inmunoterapias específicas en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

20

El sistema inmunitario reconoce antígenos extraños y organiza una respuesta coordinada que involucra múltiples tipos de células que da como resultado la eliminación de los antígenos extraños o el patógeno o la célula que expresa los antígenos extraños. El sistema inmunitario es crucial para la protección contra los microorganismos invasores, que incluyen, pero sin limitarse a, bacterias, virus y parásitos, y la vigilancia y eliminación de células anormales o mutadas (cáncer). Este sistema proporciona además un obstáculo en las intervenciones terapéuticas por reacción a la inserción de dispositivos médicos en el cuerpo o al trasplante de órganos o células heterólogas.

25

Además de las funciones básicas del sistema inmunitario en la protección del animal huésped, existe una gran promesa para modular el sistema inmunitario en beneficio del tratamiento de la enfermedad. En este sentido, aprovechar el sistema inmunitario del propio paciente para atacar y tratar el cáncer del paciente puede ser un enfoque terapéutico muy prometedor para muchos tipos diferentes de cáncer.

30

A pesar de los recientes éxitos de la inmunoterapia para el tratamiento del cáncer, la respuesta de los tumores humanos es variable entre los individuos y en aquellos donde funciona, a menudo es solo parcialmente exitosa.

35

Por lo tanto, existe la necesidad de enfoques que puedan mejorar la capacidad de las inmunoterapias para tratar el cáncer.

Resumen de la invención

40

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Los aspectos de la invención se refieren a enfoques novedosos para estimular la función inmunitaria mediante el uso de un compuesto farmacéutico complejo de carbohidratos, solo o en combinación con otra inmunoterapia dirigida que puede aumentar la eficacia de la inmunoterapia del cáncer.

45

Los aspectos de la invención se refieren a composiciones, composiciones para usar y métodos de fabricación de composiciones capaces de estimular la función inmunitaria.

50

En la presente además se describen métodos de tratamiento a un sujeto que lo necesita. El método puede comprender la etapa de obtener una composición para su administración por vía intravenosa, subcutánea, otras vías de administración parenteral u oral, la composición que comprende un compuesto en un portador farmacéutico aceptable y administrar la composición a un sujeto que la necesita.

55

En algunas modalidades, el compuesto es galactoarabino-ramnogalacturonato (GA-RG). Otros ejemplos incluyen galacto-ramnogalacturonato (GRG), galactomanano (GM), disacáridos sintéticos modificados (MSD), agentes inhibidores de péptidos/proteínas (PIA), agentes peptidomiméticos (PMA), anticuerpos específicos de galectina (GSA) o moléculas orgánicas pequeñas (SOM) o una combinación de cualquiera de los anteriores.

60

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG específicos pueden tener la capacidad de interactuar con diversos dominios de la clase de proteínas galectina, que incluye galectinas 1 a 15, y de ese modo inhibir, mejorar o modular su función.

65

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG específicos pueden tener la capacidad de interactuar con diversos dominios de la proteína galectina-3 que incluyen, pero sin limitarse a, la cara F de arena del dominio de reconocimiento de carbohidratos y el dominio N-terminal, y por lo tanto inhibir su interacción con ligandos naturales que inhiben la función de galectina-3.

65

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG específicos pueden tener la capacidad de interactuar con diversos dominios de la proteína galectina-1, que incluyen, pero sin limitarse a, el dominio de reconocimiento de carbohidratos y el dominio de dimerización, y de ese modo inhibir su interacción con ligandos naturales que inhiben la función de galectina-1.

5

En algunos ejemplos, el compuesto puede ser un polisacárido definido químicamente como galacto-ramnogalacturonato (GRG), un heteropolímero ramificado selectivamente despolimerizado cuyo esqueleto está compuesto predominantemente por porciones de ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4, con una composición menor de esqueleto de GalA unido por 1,4 y ramnosa unida por 1,2 (Rha) alternos, que a su vez se une a cualquier número de cadenas laterales, que incluye predominantemente residuos de 1,4-b-D-galactosa (Gal) con cantidades menores de 1,5-a-L-arabinosa (Ara). Otros constituyentes menores de la cadena lateral pueden incluir xilosa (Xyl), glucosa (Glu) y fucosa (Fuc) o combinaciones de los mismos.

10

En algunos ejemplos, el compuesto GRG puede producirse como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 2008/0107622, ahora patente de Estados Unidos 8.236.780.

15

En algunos ejemplos, el compuesto GRG puede producirse como se describe en las patentes de Estados Unidos 8,128,966, 8,187,624, publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos Núms. 2012/0315309 y 2012/0309711.

20

En algunas modalidades, el compuesto puede ser un polisacárido químicamente definido como galactoarabinoramnogalacturonato (GA-RG), un heteropolímero ramificado despolimerizado selectivamente cuyo esqueleto está compuesto predominantemente por residuos de ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4 y de galacturonato de metilo (MeGalA), con una composición menor de esqueleto de GalA unido por 1,4 y ramnosa (Rha) unida por 1,2, que a su vez se une a cualquier número de cadenas laterales, que incluyen predominantemente residuos de 1,4-b-D-galactosa (Gal) y de 1,5-a-L-arabinosa (Ara). Otros constituyentes menores de la cadena lateral pueden incluir xilosa (Xyl), glucosa (Glu) y fucosa (Fuc) o combinaciones de los mismos.

25

Además se describen métodos que comprenden (a) obtener una composición para administración parenteral o enteral que comprende: un galactoarabino-ramnogalacturonato que comprende un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4 y de galacturonato de metilo (MeGalA), unido a heteropolímeros ramificados de oligómeros alternos de residuos de ramnosa unidos por α -1,2 y GalA unidos por α -1,4, los residuos de ramnosa que llevan una ramificación primaria de oligómeros de residuos de 1,4- β -D-galactosa, residuos de 1,5- α -L-arabinosa, o combinaciones de los mismos, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunomodulador; en un portador farmacéutico aceptable; y (b) administrar a un sujeto que lo necesite una dosis eficaz de la composición que resulta en uno o más de lo siguiente: aumento de al menos 10 % en la activación de células T CD8+, de las células T CD4+, o de las células T CD8+ y células T CD4+, al menos 10 % de aumento de células T CD8+ o CD4+ específicas de antígenos tumorales; al menos 10 % de disminución en el tamaño del tumor, al menos 10 % de disminución en el tamaño de las metástasis, al menos un 10 % de disminución en el número de metástasis, una reducción de la carga total del tumor en comparación con un sujeto de control tratado solo con la cantidad terapéuticamente eficaz de agente inmunomodulador. En algunas modalidades, el sujeto que lo necesita es un sujeto que tiene cáncer. En algunas modalidades, la etapa de administrar da como resultado al menos una reducción de 50 % de la carga tumoral total en el sujeto para tratar el cáncer.

30

35

40

En la etapa de obtener el galactoarabinoramnogalacturonato, el esqueleto de residuos de ácido galacturónico unido por 1,4 y de galacturonato de metilo pueden representar entre 55 a 85 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el heteropolímero ramificado de residuos alternos de ramnosa unida por α -1,2 y de GalA unido por 1,4 puede representar entre 1 y 6 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el oligómero de 1,4- β -D-galactosa de la ramificación primaria puede representar entre 6 a 15 por ciento molar de carbohidratos totales, y el oligómero de 1,5- α -L-arabinosa de la ramificación primaria puede representar entre 2 y 8 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, según se caracteriza por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

50

En algunas modalidades, el galactoarabinoramnogalacturonato puede tener un peso molecular promedio que varía de 20 kDa a 70 kDa. En algunas modalidades, el galactoarabino-ramnogalacturonato comprende además residuos de xilosa, glucosa, fucosa o una combinación de los mismos.

55

En algunos ejemplos, el compuesto puede ser un agente inhibidor de péptidos/proteínas (PIA) que puede unirse a galectina e inhibir la función de galectina. En algunas modalidades, el agente inhibidor de péptidos/proteínas puede incluir, pero no se limita a Anginex. Anginex puede producirse, en algunas modalidades, como se describe en la patente de Estados Unidos 6.770.622.

60

En algunos ejemplos, el compuesto puede ser un agente peptidomimético (PMA) que puede unirse a la galectina e inhibir la función de la galectina. En algunas modalidades, el PMA puede ser, sin limitarse a, OTX-008 (también conocido como PTX-008). En algunos ejemplos, el agente peptidomimético puede incluir, pero sin limitarse a, el PMA producido como se describe en la Patente de Estados Unidos 8.207.228.

En algunos ejemplos, el compuesto puede ser un anticuerpo específico de galectina (GSA), que incluye pero sin limitarse a, un anticuerpo monoclonal que se une e inhibe a la galectina-3 u otros miembros de la familia de proteínas de la galectina.

5 En algunos ejemplos, el compuesto puede ser una molécula orgánica pequeña (SOM) que puede interactuar con diversos dominios de moléculas de galectina que incluyen, pero sin limitarse a, el dominio de unión a carbohidratos y el dominio de dimerización de proteínas.

10 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal, péptido u otro agente que se une a ligandos o receptores coestimulantes de linfocitos y actúan ya sea como antagonistas o como agonistas de la coestimulación. Los receptores coestimuladores pueden incluir, pero sin limitarse a, CD28 e ICOS. Los ligandos coestimuladores pueden incluir, pero sin limitarse a, los ligandos CD80, CD86 y ICOS. El documento US 2008/0089959 describe una composición contra el cáncer que comprende una pectina modificada (GCS-100) que se sabe
15 que inhibe la galectina-3 y un inhibidor del punto de regulación inmunitario.

20 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal, péptido u otro agente que se une a ligandos o receptores inhibidores de linfocitos y actúan como antagonistas o agonistas de la inhibición de linfocitos. Los receptores inhibidores pueden incluir, pero sin limitarse a, CTLA-4 y LAG-3 (gen 3 de Linfocitoactivación; también designado como CD223). Los ligandos inhibidores pueden incluir, pero sin limitarse a, CD80 y CD86.

25 En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a CTLA-4 (anti-CTLA4).

30 En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal, péptido u otro agente que se une a la superfamilia de receptores del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) o sus ligandos que se expresan en linfocitos y actúan como antagonistas o agonistas de la coestimulación de linfocitos. Los miembros de la superfamilia de receptores TNFR pueden incluir, pero sin limitarse a, CD134, también conocido como OX40, CD27 y 4-1BB, y ligandos de receptores TNFR, que incluyen pero sin limitarse, a OX40L y CD70 y 4-1BBL (CD137L).

35 En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a OX40 (anti-OX40). En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de OX40L recombinante u otros agonistas de OX40.

40 En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a ligandos PD (anti-PD-L1 y PD-L2).

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a PD-1 (anti-PD-1).

45 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal, péptido u otro(s) agente(s) que modifique(n) la activación o la función de las células dendríticas de modo que se altera el procesamiento o la respuesta del antígeno.

50 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna contra el cáncer. En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna dirigida a antígenos tumorales.

55 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna usada con el fin de tratar o prevenir una enfermedad infecciosa.

60 Además en la presente descripción se describe un método para tratar el cáncer que comprende (a) obtener una composición para administración parenteral o enteral que comprende un galactoarabino-ramnogalacturonato en un portador farmacéutico aceptable, el galactoarabino-ramnogalacturonato que comprende esqueleto de residuos de un ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4 y galacturonato de metilo (MeGalA) unidos a heteropolímeros ramificados de oligómeros alternos de residuos de ramnosa unida por α -1,2 y GalA unidos por α -1,4, los residuos de ramnosa portan una ramificación primaria de oligómeros de residuos de 1,4- β -D galactosa, residuos de 1,5- α -L-arabinosa, o
65 combinaciones de los mismos; y (b) administrar a un sujeto que lo necesite una dosis eficaz de la composición que puede dar como resultado al menos uno de los siguientes: al menos 10 % de aumento en la activación de células T CD8+, de

5 células T CD4+ o de células T CD8+ y células T CD4+, aumento de al menos 10 % de células T CD8+ o CD4+ específicas de antígenos tumorales; al menos un 10 % de disminución en el tamaño del tumor, al menos un 10 % de disminución en el tamaño de las metástasis, al menos un 10 % de disminución en el número de metástasis, una reducción de la carga total del tumor en comparación con un sujeto control tratado con una cantidad terapéuticamente eficaz de terapia aprobada para el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades, la etapa de administrar puede dar como resultado al menos una reducción de 50 % de la carga tumoral total en el sujeto para tratar el cáncer.

10 En algunos ejemplos, en la etapa de obtener el galactoarabino-ramnogalacturonato, el esqueleto de residuos de ácido galacturónico unido por 1,4 y galacturonato de metilo pueden representar entre 55 y el 85 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el heteropolímero ramificado de residuos alternos de ramnosa unidos por α -1,2 y GalA unidos por α -1,4 pueden representar entre 1 y 6 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el oligómero 1,4- β -D-galactosa de la ramificación primaria puede representar entre 6 y 15 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales y el oligómero de 1,5- α -L-arabinosa de la ramificación primaria puede representar entre 2 y 8 % molar del contenido molar de carbohidratos totales, según se caracteriza por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

15 En algunos ejemplos, el galactoarabino-ramnogalacturonato puede tener un peso molecular promedio que varía de 20 kDa a 70 kDa. En algunas modalidades, el galactoarabino-ramnogalacturonato puede comprender además residuos de xilosa, glucosa, fucosa o una combinación de los mismos.

20 El método descrito puede comprender (a) obtener una composición para administración parenteral o enteral que comprende: (i) uno de galacto-ramnogalacturonato (GRG), galactoarabino-ramnogalacturonato (GARG), galactomanano (GM), disacáridos sintéticos modificados (MSD), agentes inhibidores de péptidos/proteínas (PIA), agentes peptidomiméticos (PMA), anticuerpos específicos de galectina (GSA) o moléculas orgánicas pequeñas (SOM) o una combinación de cualquiera de los anteriores, y (ii) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunomodulador, en donde el agente inmunomodulador, comprende un anticuerpo monoclonal, péptido, agente capaz de unirse a uno o más ligandos o receptores coestimuladores de linfocitos, ligandos o receptores inhibidores de linfocitos, superfamilia de receptores del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), ligandos PD o una combinación de cualquiera de los anteriores; en donde la composición está en un portador farmacéutico aceptable. El método comprende además administrar a un sujeto que lo necesite una dosis eficaz de la composición que puede dar como resultado al menos uno de los siguientes: al menos 10 % de aumento en la activación de las células T CD8+, de las células T CD4+ o de las células T CD8+ y células T CD4+, al menos 10 % de aumento de las células T CD8+ o CD4+ específicas de antígenos tumorales; al menos 10 % de disminución en el tamaño del tumor, al menos un 10 % de disminución en el tamaño de las metástasis, al menos un 10 % de disminución en el número de metástasis, una reducción de la carga tumoral total en comparación con un sujeto control tratado solo con la cantidad terapéuticamente eficaz del agente inmunomodulador. En algunos ejemplos, la etapa de administrar puede resultar en al menos una reducción de 50 % de la carga tumoral total en el sujeto para tratar el cáncer.

35 En algunos ejemplos y modalidades, el agente inmunomodulador puede ser un anticuerpo anti-OX40, anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti PD-L2, anticuerpo contra 4-1BB/4-1BBL, anticuerpo contra LAG-3, o una combinación de los mismos.

40 Otros aspectos de la invención se refieren a la composición para administración parenteral, en donde la composición está en un portador farmacéutico aceptable y comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un galactoarabino-ramnogalacturonato que comprende un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4 y galacturonato de metilo (MeGalA) unidos a heteropolímeros ramificados de oligómeros alternos de residuos de ramnosa unida por α -1,2 y GalA unidos por α -1,4, los residuos de ramnosa portan una ramificación primaria de oligómeros de residuos de 1,4- β -D-galactosa, residuos de 1,5- α -L-arabinosa, o combinaciones de los mismos, y (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunomodulador. En algunas modalidades, la composición puede usarse en el tratamiento del cáncer.

45 En algunas modalidades, el inmunomodulador puede comprender un anticuerpo monoclonal, péptido, agente capaz de unirse a uno o más ligandos o receptores coestimuladores de linfocitos, ligandos o receptores inhibidores de linfocitos, superfamilia de receptores del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), ligandos PD o una combinación de cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, el agente inmunomodulador puede ser un anticuerpo anti-OX40, anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti PD-L2, anticuerpo contra 4-1BB/4-1BBL, anticuerpo contra LAG-3 o un combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

50 La presente invención se explicará adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos, donde se hace referencia a estructuras similares mediante números similares en las diversas vistas. Los dibujos mostrados no están necesariamente a escala, sino que generalmente se hace hincapié en ilustrar los principios de la presente invención.

55 La FIGURA 1 representa el porcentaje de linfocitos de sangre periférica de diferentes grupos experimentales analizados para el porcentaje de células CD8+ que expresan granzima B.

60 La FIGURA 2 representa el porcentaje de linfocitos de sangre periférica de diferentes grupos experimentales analizados para el porcentaje de células CD8+ que expresan Ki-67.

La FIGURA 3 representa el porcentaje de linfocitos de sangre periférica de diferentes grupos experimentales analizados para el porcentaje de células CD4+ que expresan Ki-67.

La FIGURA 4 representa el tamaño de los tumores de próstata TRAMP-C1 en ratones en el día 13 en los diferentes grupos experimentales.

5 La FIGURA 5 representa el tamaño de los tumores de próstata TRAMP-C1 en ratones en los días 19, 25, 29 y 33 para los diferentes grupos experimentales.

La FIGURA 6 representa curvas de supervivencia para los diferentes grupos experimentales con cáncer de próstata TRAMP-C1.

10 La FIGURA 7 representa el tamaño de los tumores de mama en ratones en los días 11, 14, 20 y 25 para los diferentes grupos experimentales.

La FIGURA 8A representa la supervivencia en experimentos con el uso de tumores de carcinoma mamario 4T1 en ratones con terapia con aOX40 solo o en combinación con GA-RG (marcado como MD02). La FIGURA 8B representa las metástasis pulmonares en experimentos con el uso de tumores de carcinoma mamario 4T1 en ratones con terapia con aOX40 solo o en combinación con GA-RG (marcado como MD02).

15 La FIGURA 9A representa el porcentaje de células GR-1 negativas/CD11b positivas en la circulación de ratones que padecen de tumor de mama 4T1 tratados con aOX40 solo o en combinación con GA-RG (marcado como MD02). La Figura 9B representa el porcentaje de células GR-1 intermedias/CD11b positivas en la circulación de ratones que padecen de tumor de carcinoma mamario 4T1 tratados con aOX40 solo o en combinación con GA-RG (marcado como MD02 en estas figuras). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

20 La FIGURA 10A muestra la respuesta de los ratones que padecen de tumor de sarcoma MCA-205 al tratamiento con aOX40 solo o en combinación con GA-RG (marcado como MD02 en estas figuras). La Figura 10B muestra las curvas de supervivencia para los mismos grupos de animales.

25 La Figura 11A representa la expresión de la proteína galectina-3 secretada en los medios en diversas líneas celulares tumorales. La FIGURA 11B representa la expresión de la proteína galectina-3 en el lisado de células enteras en varias líneas celulares tumorales.

La FIGURA 12A representa una comparación fenotípica de células T CD8 deficientes en galectina-3 no tratadas frente a células T CD8 de tipo salvaje mediante análisis de citometría de flujo de diversos marcadores. La FIGURA 12B es un esquema del modelo usado en el experimento.

30 La FIGURA 13A-C representa que las células T CD8 deficientes en galectina-3 exhiben una función efectora reducida después de la estimulación in vivo con antígeno. La FIGURA 13A muestra el porcentaje de células CD8 OT-I positivas/totales en animales de tipo salvaje y deficientes en gal-3. La Figura 13B muestra diferencias en la expresión de marcadores en linfocitos CD8 tipo salvaje y deficientes en gal-3. La FIGURA 13C muestra diferencias en la secreción de citocinas en linfocitos CD8 tipo salvaje y deficientes de gal-3.

35 La FIGURA 14 representa que los genes seleccionados están regulados negativamente en células T CD8 deficientes en galectina-3. La Figura 14A es una representación gráfica de diversos genes que se encuentran regulados negativamente en las células Gal 3 -/- OT-I sobre las células de tipo salvaje. La Figura 14B muestra las unidades relativas y los cambios en la proporción para genes seleccionados

40 La FIGURA 15 muestra la expresión de CD25 (IL2-Ra) u OX40 por citometría de flujo. La Figura 15 representa que las células T CD8 deficientes en galectina-3 tienen una expresión reducida de CD25 y OX40 después de la estimulación con antígeno.

45 La FIGURA 16A muestra el fenotipo de células donantes en sangre periférica o bazo de ratones no tratados (barras negras) o ratones administrados con un inhibidor de Gal-3, GR-MD-02 en el día 7. La FIGURA 16B muestra el fenotipo de células donantes en sangre periférica o bazo de ratones no tratados (barras negras) o ratones administrados con un inhibidor de Gal-3, GR-MD-02 en el día 29. La FIGURA 16A-B representa que la inhibición de galectina-3 con el uso de GA-RG (marcado como GR-MD-02 en esta Figura) aumenta la expansión de células T CD8 y la función efectora.

La FIGURA 17 representa que la inhibición de galectina-3 en combinación con la terapia anti-CTLA4 aumenta la generación de células T CD8 con memoria específica de antígeno en el bazo frente a anti-CTLA4 solo. GA-RG está marcado como MD02 en esta figura.

50 Descripción detallada de la invención

Se describen modalidades detalladas de la presente invención en la presente descripción; sin embargo, debe entenderse que las modalidades descritas son meramente ilustrativas de la invención que puede realizarse de diversas formas. Además, cada uno de los ejemplos dados en relación con las diversas modalidades de la invención pretenden ser 55 ilustrativos y no restrictivos. Además, las figuras no están necesariamente a escala, algunas características pueden estar exageradas para mostrar detalles de componentes particulares. Además, cualesquiera medidas, especificaciones y similares que se muestran en las figuras pretenden ser ilustrativas y no restrictivas. Por lo tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos descritos en la presente descripción no deben interpretarse como limitantes, sino simplemente como una base representativa para enseñar a un experto en la técnica a emplear de manera diversa la presente invención.

60 A menos que se especifique lo contrario, todos los porcentajes expresados en la presente descripción son peso/peso.

El término "sujeto" se refiere a un animal, que incluye, pero sin limitarse a, un primate (por ejemplo, ser humano). Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en la presente descripción en referencia, por ejemplo, a un sujeto 65 mamífero, tal como un sujeto humano.

5 Un enfoque que se ha seguido para la inmunoterapia del cáncer es el área cubierta por el término "vacunas tumorales" que incluye la inmunización con antígenos sobreexpresados o específicos de tumor. En este enfoque, un antígeno o antígenos específicos para, o sobreexpresados, en células tumorales se inyectan solos, con adyuvantes, como parte de un microorganismo que administra el antígeno (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), o después de la incubación ex-vivo con células inmunitarias (que incluyen, pero sin limitarse a, células dendríticas) para provocar respuestas inmunitarias celulares y/o humorales.

10 Otro enfoque que se ha seguido para la inmunoterapia del cáncer es a través de la modulación de la función de receptores específicos de células inmunitarias o sus ligandos. Esto se ha logrado mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen y se unen a los receptores y/o ligandos de las células inmunitarias. Se ha demostrado que la unión del anticuerpo monoclonal al receptor o ligando diana inhibe o mejora la función de ese receptor o ligando.

15 Los anticuerpos monoclonales que se han encontrado que mejoran la respuesta inmunitaria a los tumores incluyen anticuerpos que se unen a CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos), receptor PD-1 (muerte programada-1) y OX40 (también conocido como CD134). Además de su actividad en experimentos celulares y animales con tumores, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 y anti-PD-1 tienen una importante actividad antitumoral en seres humanos.

20 Los aspectos de la invención se relacionan con enfoques novedosos para estimular la función inmunitaria mediante el uso de un producto farmacéutico de carbohidratos complejos u otros agentes descritos en la presente descripción, solos o en combinación con otra inmunoterapia dirigida que puede aumentar la eficacia de la inmunoterapia del cáncer y otras enfermedades que utilizan la activación del sistema inmunitario. El término "inmunoterapia dirigida" y "agente inmunomodulador" se usan indistintamente.

25 En la presente descripción se describen métodos para tratar a un sujeto que lo necesita. En algunos ejemplos, el método comprende la etapa de obtener una composición para administración intravenosa, subcutánea, otras vías de administración parenteral u oral, la composición que comprende un compuesto en un portador farmacéutico aceptable y administrar la composición a un sujeto que lo necesite. En algunas modalidades, la composición comprende un compuesto y un agente inmunomodulador en un portador farmacéutico aceptable.

30 Otros aspectos de la invención se refieren a una formulación para administración parenteral, en donde la formulación está en un portador farmacéutico aceptable y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunomodulador.

35 En algunas modalidades, el compuesto es galactoarabino-ramnogalacturonato (GA-RG). Otros compuestos de ejemplo pueden ser uno de galacto-ramnogalacturonato (GRG), galactomanano (GM), disacáridos sintéticos modificados (MSD), agentes inhibidores de péptidos/proteínas (PIA), agentes peptidomiméticos (PMA), anticuerpos específicos de galectina (GSA) o moléculas orgánicas pequeñas (SOM) o una combinación de cualquiera de los anteriores

40 En algunas modalidades, los compuestos GA-RG específicos pueden tener la capacidad de interactuar con diversos dominios de la clase de proteínas galectina, que incluye galectinas 1 a 15, y de ese modo inhibir, mejorar o modular su función.

45 En algunas modalidades, los compuestos GA-RG específicos pueden tener la capacidad de interactuar con diversos dominios de la proteína galectina-3 que incluyen, pero sin limitarse a, la cara F de arena del dominio de reconocimiento de carbohidratos y el dominio N-terminal, y por lo tanto inhibir su interacción con ligandos naturales que inhiben la función de galectina-3.

50 En algunas modalidades, los compuestos GA-RG específicos pueden tener la capacidad de interactuar con diversos dominios de la proteína galectina-1, que incluyen, pero sin limitarse a, el dominio de reconocimiento de carbohidratos y el dominio de dimerización, y de ese modo inhibir su interacción con ligandos naturales que inhiben la función de galectina-1.

55 El término "dosis eficaz" significa la cantidad de los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción en combinación con uno o más anticuerpos, proteínas u otros agentes que modulan las respuestas inmunitarias cuando se administran como una dosis parental para un animal o ser humano con al menos 10 %, al menos 20 % o al menos 25 % de mejora de los marcadores de respuesta inmunitaria. Los marcadores de la respuesta inmunitaria incluyen, pero sin limitarse a, la proliferación de linfocitos T que tienen un receptor CD8, denominados en la presente linfocitos CD8 (como se indica por varios métodos que incluyen, pero sin limitarse a, tinción para Ki-67), marcadores de función activada de las células CD8 (según lo indicado por varios métodos que incluyen, pero sin limitarse a, la tinción de granzima B) o cambios en otras células efectoras o de regulación celular. Otros marcadores inmunitarios incluyen, pero sin limitarse a, la expresión y/o frecuencia relativa de células mononucleares GR-1+ y CD11b+.

65 Los agentes inmunomoduladores pueden incluir, pero sin limitarse a, anticuerpos contra OX40 (anti-OX40), anticuerpos contra CTLA-4 (anti-CTLA-4), anticuerpos contra PD-1 (anti-PD-1), anticuerpos contra PD-1 U2L (anti-PD-L1 o anti-PD-

L2), anticuerpos contra 4-1 BB/4-1 BBL, anticuerpos contra LAG-3 o una combinación de dos o más de los anticuerpos anteriores.

5 Los agentes inmunomoduladores pueden incluir además anticuerpos, proteínas, péptidos o moléculas orgánicas pequeñas que afectan los procesos de respuesta inmunitaria, tal como el reconocimiento dependiente de antígenos, el procesamiento de antígenos, la coestimulación de linfocitos y la inhibición de linfocitos.

10 El término "eficacia" significa demostrar una reducción del crecimiento, progresión o metástasis tumorales de al menos 10 % mediante el uso del tratamiento con los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción, ya sea solos o en combinación con agentes inmunomoduladores, o una combinación de dos o más de estos agentes, en comparación con el tratamiento con los agentes inmunomoduladores solos, o una combinación de dos o más de estos agentes.

15 En la presente se describen composiciones y métodos para usar composiciones capaces de estimular la función inmunitaria.

20 En la presente descripción se describen métodos para tratar a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el sujeto sufre de cáncer. En algunas modalidades, el método comprende la etapa de obtener una composición para administración intravenosa o subcutánea u oral que comprende un compuesto en un portador farmacéutico aceptable. En algunas modalidades, el método comprende la etapa de obtener una composición para administración parenteral. La "administración parenteral" incluye la administración por inyección o infusión en bolo, así como también la administración por vía intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subacanoide subcapsular, intraespinal, epidural, e inyección e infusión intraesternal.

25 En algunos ejemplos, el compuesto es un polisacárido químicamente definido como galacto-ramnogalacturonato (GRG), un heteropolímero ramificado selectivamente despolimerizado cuyo esqueleto está compuesto predominantemente por porciones de ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4 y residuos de galacturonato de metilo (MeGalA), con una composición de esqueleto menor de GalA unido por 1,4 y ramnosa unida por 1,2 (Rha) alternos, que a su vez se une a cualquier número de cadenas laterales, que incluyen predominantemente residuos de 1,4-b-D-galactosa (Gal) y de 1,5-a-L-arabinosa (Ara). Otros constituyentes menores de la cadena lateral pueden incluir xilosa (Xyl), glucosa (Glu) y fucosa (Fuc) o combinaciones de los mismos.

35 En algunas modalidades, el compuesto es un polisacárido químicamente definido como galactoarabinoramnogalacturonato (GA-RG), un heteropolímero ramificado selectivamente despolimerizado cuyo esqueleto está compuesto predominantemente de porciones de ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4, con una composición de esqueleto menor de GalA unido por 1,4 y ramnosa unida por 1,2 (Rha) alternos, que a su vez se une a cualquier número de cadenas laterales, que incluyen predominantemente residuos de 1,4-b-D-galactosa (Gal) y de 1,5-a-L-arabinosa (Ara). En algunas modalidades, el esqueleto de residuos de ácido galacturónico unido por 1,4 y de galacturonato de metilo representa entre 55 y el 85 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el heteropolímero ramificado de residuos alternos de ramnosa unida por α -1,2 y los GalA unido por α -1,4 representan entre 1 y 6 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el oligómero de 1,4- β -D-galactosa de la ramificación primaria representa entre 6 y 15 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales y el oligómero de 1,5- α -L-arabinosa de la ramificación primaria representa entre 2 y 8 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, como se caracteriza por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

Otros constituyentes menores de la cadena lateral pueden incluir xilosa (Xyl), glucosa (Glu) y fucosa (Fuc) o combinaciones de los mismos.

50 En algunas modalidades, el porcentaje molar de los residuos 1,4-b-D-Gal y 1,5-a-L-Ara en el compuesto GA-RG de la presente invención es 21,5 % con una relación molar de 3:1 de 1,4-b-D-Gal con 1,5-a-L-Ara.

55 En algunas modalidades, el compuesto es un polisacárido químicamente definido como galactoarabinoramnogalacturonato (GA-RG), con un intervalo de peso molecular de 20,000 a 70,000 Daltons según se determina por el método SEC-RI. En algunas modalidades, el galactoarabino-ramnogalacturonato tiene un peso molecular promedio que varía de 20 kDa a 70 kDa.

60 En algunas modalidades, el compuesto GA-RG puede producirse como se describe en la publicación de patente internacional WO 2013/101314. La pectina de manzana USP HM (50 kg) se disolvió y se calentó en agua a 35-85 °C. Se añadió HCl 1 M o NaOH para ajustar el pH de la solución a pH 5-7 y se mezcló bien. La mezcla continuó durante 2 horas en el punto de ajuste de 35-85 °C. Se añadió NaOH 1 M o HCl según se necesitó para reajustar el pH a entre 5 y 7. La solución se enfrió a 30 °C. A 30 °C, el pH se ajustó a entre 5 y 7. Se añade CuSO₄ a la solución de pectina con pH ajustado para dar como resultado una concentración final de CuSO₄ 1 mM. La solución de CuSO₄ 1 mM se mezcló durante 30 minutos a una temperatura de entre 10 °C y 30 °C. Al final de los 30 minutos, la etapa de mezclado de CuSO₄ 1 mM, se añadieron 50 gramos de ascorbato de sodio (la cantidad se precalibró para lograr el MW deseado) y se mezcló durante 5 a 20 minutos. Se añadió H₂O₂ a partir de 0,02 y hasta 1,0 moles/kg de pectina (precalibrado para el arranque inicial del MW de pectina) y la concentración de H₂O₂ se mantuvo durante 4 horas (mediante el uso de la prueba cuantitativa, Sigma,

St Louis), mientras que el pH de la solución se mantuvo entre 4 y 7. Se añadió NaOH 5 M a la solución para dar como resultado un pH de solución de entre 8 y 10. La solución con pH ajustado se mezcló durante 10-30 minutos. Después se añadió HCl concentrado a la solución con pH ajustado para ajustar el pH de la solución entre 4 y 5. La solución, una vez ajustada a pH entre 4 y 5, puede mantenerse mezclada durante 2 a 24 horas entre 2 °C y 8 °C. La solución se calentó después a 80 °C durante 30-180 minutos y se añadieron 1-5 kg de filtro ayuda (Celite) a la solución, y la solución con Celite añadida se agitó durante 30 minutos y después se filtró. Los sólidos resultantes de la filtración fueron descartados. El filtrado se concentró 1,5 - 3X al vacío, y después se ajustó el pH a entre 3 y 5. Se añadió etanol o isopropanol calientes en un peso de 50 %. La mezcla se agitó durante 1-2 horas para precipitar el producto, y después la mezcla se filtró. El filtrado se desechó, mientras quedó un precipitado blanco a blanquecino. Se añadió EtOH al 96 % frío a la solución y la suspensión resultante se agitó después durante 30 minutos. La solución se filtró y el filtrado se desechó. Se repitió la etapa de suspensión de EtOH al 96 %, seguido de una filtración final y recuperación de un precipitado blanco a blanquecino.

En algunas modalidades, GA-RG se une a la molécula de galectina-3 en múltiples residuos de aminoácidos en el dominio canónico de reconocimiento de carbohidratos en la cara del dominio de unión de sándwich beta, así como también residuos de aminoácidos en la cara F opuesta de la proteína.

En algunas modalidades, la unión de GA-RG a los residuos de aminoácidos en la molécula de galectina-3 es responsable de interferir con la función de la molécula de galectina-3.

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción se usan en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a CTLA-4 (anti-CTLA-4). El CTLA-4 (Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos), también conocido como CD152 (Grupo de diferenciación 152), es un receptor de proteína que regula negativamente el sistema inmunitario y puede encontrarse en la superficie de las células T, que conducen al ataque del sistema inmunitario celular en los antígenos.

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción se usan en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal agonista que se une a OX40 (anti-OX40) o OX40L recombinante que actúa como agonista. OX40 es miembro de la familia del factor de necrosis tumoral/receptor del factor de crecimiento nervioso (TNFR/NGFR). OX40 puede desempeñar un papel en la activación de células T, así como también en la regulación de la diferenciación, proliferación o apoptosis de células linfoides normales y malignas.

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción se usan en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a PD-1 (anti-PD-1). PD-1 se refiere a la proteína 1 de muerte celular programada que es miembro de la familia de reguladores de células T CD28/CT-LA-4.

En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal, péptido u otro agente que se une a los coestimuladores de linfocitos, ligandos o receptores y actúan como antagonistas o agonistas de la coestimulación. Los receptores coestimuladores incluyen, pero sin limitarse a, CD28 e ICOS y los ligandos incluyen, pero sin limitarse a, ligandos CD80, CD86 y ICOS.

En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal, péptido u otro agente que se une a ligandos o receptores inhibidores de linfocitos y actúan como antagonistas o agonistas de la inhibición de linfocitos. Los receptores inhibidores incluyen, pero sin limitarse a, CTLA-4 y los ligandos incluyen, pero sin limitarse a, CD80 y CD86.

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a CTLA-4 (anti-CTLA-4).

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal, péptido u otro agente que se une a la superfamilia de receptores del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) o sus ligandos que se expresan en linfocitos y actúan como antagonistas o agonistas de la coestimulación de linfocitos. Los miembros de la superfamilia de receptores TNFR incluyen, pero sin limitarse a, CD134, también conocido como OX40, 4-1BB (CD137), y CD27 y ligandos de receptores TNFR que incluyen pero sin limitarse a OX40L, 4-1BBL (CD137L) y CD70.

En algunos ejemplos, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a OX40 (anti-OX40), los compuestos GA-RG o GM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con un cantidad terapéuticamente eficaz de OX40L recombinante u otros agonistas de OX40.

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a ligandos PD (anti-PD-L1 y PD-L2).

En algunas modalidades, los compuestos GA-RG descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal que se une a PD-1 (anti-PD-1).

5 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo monoclonal, péptido u otro agente que modifique la activación o función de células dendríticas, de ese modo se altera el procesamiento o la respuesta del antígeno.

10 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna dirigida contra el antígeno tumoral o una vacuna contra el cáncer. En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con adyuvantes. Los adyuvantes, en algunas modalidades, pueden incluir ligandos TLR tales como polil: C, CpG y similares.

15 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en el presente documento pueden usarse solos en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna dirigida al antígeno tumoral o una vacuna contra el cáncer.

20 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna usada con el fin de tratar o prevenir una enfermedad infecciosa.

25 En algunos ejemplos, los compuestos GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA o SOM descritos en la presente descripción pueden usarse solos en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los agentes o combinaciones anteriores o cualquiera de los agentes anteriores.

30 Una dosis intraperitoneal o intravenosa eficaz del polisacárido GA-RG usado en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz de anti-OX40, anti-CTLA4, anti-PD-1 u otro agente inmunomodulador, o combinación de cualquiera de los anteriores, a un animal experimental (por ejemplo, ratón) puede estar entre 10 y 120 mg/mg administrados una vez por semana, dos veces por semana o tres veces por semana.

35 Una dosis intravenosa o dosis efectiva de GA-RG usada en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz de anti-OX40, anti-CTLA-4, anti-PD-1 u otro agente inmunomodulador o combinación de cualquiera de los anteriores, para un sujeto humano puede estar entre 0,5 y 15 mg/kg administrados una vez a la semana, dos veces a la semana o tres veces por semana, calculado a partir de la equivalencia de la dosis en animales.

40 Una dosis eficaz de GA-RG usada en combinación con una dosis terapéuticamente eficaz de anti-OX40, anti-CTLA-4, anti-PD-1 u otro agente inmunomodulador, o combinación de cualquiera de los anteriores, para un sujeto humano puede administrarse por vía subcutánea, por otras vías parenterales, o por vía oral en múltiplos de entre 1 y 100 veces la dosis intravenosa.

45 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se determina por al menos un aumento en 10 % en la proliferación de células T CD8+ o CD4+. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se determina por al menos un aumento en 15 % en la proliferación de células T CD8+ o CD4+. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se determina por al menos un aumento en 20 % en la proliferación de células T CD8+ o CD4+.

50 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se determina por al menos un aumento en 10 % en la proliferación de células T CD8+ o CD4+, medido por la expresión de Ki-67. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se determina por al menos un aumento en 15 % en la proliferación de células T CD8+ o CD4+, medido por la expresión de Ki-67. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se determina por al menos un aumento en 20 % en la proliferación de células T CD8+ o CD4+, medido por la expresión de Ki-67.

55 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral no está asociada con la proliferación general de células T CD8+ o CD4+.

60 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se determina mediante al menos un aumento en 10 % hasta 25 % en la activación de células T CD8+ o células T CD4+. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se determina mediante al menos un aumento en 15 % hasta 25 % en la activación de las células T CD8+ o las células T CD4+. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se determina por al menos un aumento en 20 % en la activación de las células T CD8+ o las células T CD4+.

65 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se determina por al menos un aumento de 10 % en la activación de células T CD8+ o células T CD4+ medido por la expresión de granzima B. En algunos

ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se determina por al menos un aumento en 15 % en la activación de células T CD8+ o células T CD4+ según se mide por la expresión de granzima B. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se determina por al menos un aumento en 20 % en la activación de las células T CD8+ o las células T CD4+ medido por la expresión de granzima B.

5 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral no está asociada con un aumento general en la expresión de granzima B en células T CD8+ o CD4+.

10 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral está asociada con un aumento en al menos 10 % de las células T CD8+ o CD4+ específicas de antígeno tumoral. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral está asociada con un aumento de al menos 15 % de las células T CD8+ o CD4+ específicas de antígeno tumoral. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral está asociada con un aumento en al menos 20 % de las células T CD8+ o CD4+ específicas de antígeno tumoral.

15 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral está asociada con un aumento en al menos 10 % de las células GR-1 negativas/CD11b positivas. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral está asociada con un aumento en al menos 15 % de las células GR-1 negativas/ CD11b positivas. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral está asociada con un aumento en al menos 20 % de las células GR-1 negativas CD11b positivas.

20 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral está asociada con una disminución en al menos 10 % de células GR-1 intermedias o positivas/CD11b positivas. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral está asociada con una disminución en al menos 15 % de células GR-1 intermedias o positivas/CD11b positivas. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral está asociada con una disminución en al menos 20 % de las células GR-1 intermedias o positivas/CD11b positivas.

25 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se asocia con una disminución en al menos el 10 % del tamaño del tumor (en comparación con su tamaño al comienzo del tratamiento). En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se asocia con una disminución en al menos 15 % del tamaño del tumor. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se asocia con una disminución en al menos 20 % del tamaño del tumor.

30 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se asocia con una disminución en al menos 10 % del tamaño o número de metástasis a distancia del tumor primario. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral se asocia con una disminución en al menos 15 % del tamaño o número de metástasis a distancia del tumor primario. En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral se asocia con una disminución en al menos 20 % del tamaño o número de metástasis a distancia del tumor primario.

35 La suma total del volumen ocupado por todas las lesiones puede representarse en términos de un solo número llamado "Carga tumoral total" (TTB). Como tal, cuando cualquiera de los tumores responde a un plan de tratamiento elegido, la TTB cambiará. La TTB puede determinarse en un sujeto después del tratamiento con la terapia de combinación que comprende el compuesto descrito en la presente descripción (por ejemplo, un compuesto de carbohidrato) en combinación con un agente inmunomodulador y se compara con la TTB de un sujeto tratado con el agente inmunomodulador solo. Alternativamente, la TTB puede determinarse en un sujeto después del tratamiento con el compuesto descrito (por ejemplo, compuesto de carbohidrato) en la presente descripción y compararse con la TTB de un sujeto tratado con una terapia estándar (por ejemplo, agente aprobado para el tratamiento de un cáncer).

40 Los tumores tratados con el compuesto de carbohidrato (por ejemplo, GA-RG) solo o en combinación con otras inmunoterapias (por ejemplo, agentes inmunomoduladores) pueden evaluarse mediante el uso de los criterios de respuesta relacionados con el sistema inmunitario en tumores sólidos. Los criterios de respuesta relacionados con el sistema inmunitario usados pueden ser los criterios descritos por Hoos y otros (J Natl Cancer Inst. 102:1388-1397 y Clinical Cancer research 15:74, 2009). La mensurabilidad tumoral puede definirse como 5 X 5 mm o más en exploraciones de tomografías computarizadas helicoidales. La suma de los diámetros perpendiculares (SPD) de las lesiones índice al inicio del estudio puede añadirse a la de las nuevas lesiones para calcular la carga tumoral total (TTB) de acuerdo con la siguiente fórmula: Carga tumoral total = SPD de las lesiones índice + SPD nuevas lesiones medibles.

55 El cambio en la carga tumoral puede evaluarse en relación con la carga tumoral basal, es decir, la SPD de todas las lesiones índice al inicio. Si hay una reducción de 100 % del índice y una nueva carga tumoral medible respecto a la carga tumoral basal, la respuesta general es irCR (respuesta completa relacionada con el sistema inmunitario). Si hay una reducción mayor o igual a 50 % del índice y una nueva carga tumoral medible respecto a la carga tumoral basal, la respuesta general es irPR (respuesta parcial relacionada con la respuesta inmunitaria). Si hay una disminución de menos de 50 % a un aumento de menos de 25 % en el índice y una nueva carga tumoral medible respecto a la carga tumoral basal, la respuesta general es irSD (respuesta estable relacionada con el sistema inmunitario). Si hay un aumento mayor

o igual a 25 % en el índice y una nueva carga tumoral medible respecto a la carga tumoral basal, la respuesta general es irPD (Enfermedad progresiva de respuesta relacionada con el sistema inmunitario), con la suposición que la respuesta y la progresión se confirmen mediante una segunda evaluación al menos 4 semanas de diferencia.

5 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para administración parenteral está directamente relacionada con el nivel de expresión de galectina-3 en el tumor con una mayor eficacia asociada con una mayor expresión de galectina-3 en el tumor.

10 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral en la terapia del cáncer puede estar directamente relacionada con el nivel de expresión de galectina-3 en las células tumorales y la galectina-3 secretada en el microambiente tumoral con niveles aumentados de galectina-3 relacionados con una mejor eficacia.

15 En algunos ejemplos, la eficacia de la composición para la administración parenteral puede usarse en la terapia de múltiples cánceres que incluye, pero sin limitarse a, cánceres gastrointestinales (esófago, estómago, intestino delgado, colon y anal), cáncer pancreático (endocrino y adenocarcinoma), cáncer del conducto biliar, cánceres de hígado de varios tipos, sarcomas, miosarcomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de boca, cáncer de piel, melanoma, cáncer de riñón, urinario y de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cánceres neurológicos (cerebro y nervios), cáncer de glándulas endocrinas (tiroides, suprarrenales, paratiroides, pituitaria), cáncer de huesos (osteosarcoma), cánceres hematológicos (linfoma, leucemia), mieloma múltiple y mielofibrosis.

20 En algunos ejemplos, el método de tratamiento comprende además las etapas de administrar a un sujeto una dosis eficaz de la composición para administración parenteral o en combinación con un anticuerpo inmunomodulador o que da como resultado al menos uno de los siguientes:

25 al menos un aumento de 10 % en la evidencia de activación en las células T CD8+ o CD4+ circulantes como se indica por una variedad de métodos que incluyen pero sin limitarse a Ki-67 y/o expresión de granzima B.

al menos un aumento de 10 % en las células T CD8+ o CD4+ específicas de antígenos tumorales.

30 al menos una tasa de respuesta de 10 % en el tamaño o progresión del tumor, supervivencia libre de progresión (supervivencia del paciente sin progresión del cáncer) o un aumento general de la supervivencia del paciente.

al menos una reducción de 10 % en el tamaño o el número de metástasis distantes del tumor primario.

35 una diferencia estadísticamente significativa en la carga tumoral total según lo evaluado por los criterios de respuesta relacionados con el sistema inmunitario en comparación con la terapia estándar sola, ninguna terapia o terapia que comprende el agente inmunomodulador solo.

EJEMPLO 1: Mejora de la respuesta inmunitaria del tumor de próstata seguido del tratamiento conjunto con anti-cT-LA-4, anti-oX40 o anti-pD-1 en combinación con GA-RG y GM

40 En este ejemplo, se realizaron experimentos en un modelo singénico de cáncer de ratón. Las células tumorales usadas fueron de la línea celular TRAMP-C1 que se derivó de un cáncer de próstata de ratón. Para derivar estas células, el antígeno T grande de SV40 se expresó en un ratón transgénico con un promotor genético específico de próstata, que expresa de ese modo T grande de SV40 específicamente en tejido de próstata. La línea celular TRAMP-C1 se deriva de los tumores de próstata resultantes; notablemente, la línea celular no expresa el antígeno T grande de SV40. Para el modelo tumoral, se inocularon células TRAMP-C1 (1 X 10⁶ células) en ratones C57BL/6 normales mediante inyección subcutánea.

50 Después de la inoculación con células TRAMP-C1, los grupos de ratones se trataron mediante inyección intraperitoneal con IgG (como control, en los días 4, 6 y 8 después de la inoculación), o anti-CTLA-4 (200 microgramos en los días 4, 6 y 8 después de la inoculación), o anti-PD-1 (200 microgramos en los días 4, 6 y 8 después de la inoculación), o anti-OX40 (250 microgramos en los días 4 y 8 después de la inoculación).

55 Otros grupos de animales se trataron con los mismos compuestos que antes, más GA-RG o GM como se describe a continuación: GA-RG, 2,4 mg/dosis en los días 4, 6 y 8, o GM, 2,4 mg /dosis en los días 4, 6 y 8 seguido de GA-RG el 28, 30 y 32.

60 La Figura 1 muestra los resultados de los experimentos para los diferentes grupos de animales experimentales (5 ratones por grupo). La medición, representada en el eje y, es el porcentaje de células CD8+ aisladas que además son positivas para la granzima B. La proteína granzima B es un marcador para la función efectora de los linfocitos CD8 positivos. Las granzimas son serina proteasas que se liberan mediante gránulos citoplasmáticos dentro de las células T citotóxicas CD8+ que son capaces de inducir apoptosis en células diana tales como las células tumorales o las células infectadas por virus. La comparación de solo IgG de rata (control) con aquellos animales tratados con anti-OX40 (aOX40), anti-CTLA-4 (aCTLA-4) o anti-PD-1 (aPD-1) muestra que el tratamiento de control de anticuerpos dio como resultado un aumento estadísticamente no significativo en el porcentaje de células CD8+ que expresan granzima B.

65

La Figura 1 además muestra los resultados de la adición del tratamiento con GM al tratamiento con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1. Aunque parece haber alguna activación de las células CD8+ cuando se añade GM a la terapia solo con IgG, estos cambios no fueron significativos y no hay un aumento adicional de las células positivas para granzima B cuando se añadió GM al tratamiento con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1.

En contraste, la adición del tratamiento con GA-RG al tratamiento con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1 mostró un notable aumento en la activación de las células CD8+. La adición de GA-RG al tratamiento con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1 aumentó el porcentaje de células CD8+ positivas para granzima B en 2 veces, 5 veces y 4 veces, respectivamente. Esto representa un aumento altamente significativo y notable en la activación de las células CD8+ cuando se añade GA-RG al tratamiento.

La Figura 2 muestra los resultados de un marcador de proliferación en células T CD8+ para los diferentes grupos de animales experimentales. El marcador de proliferación es Ki-67, que es una proteína nuclear asociada con la proliferación celular. Hay pocos cambios en la proliferación de células CD8+ después del tratamiento solo con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1 o en combinación con GM. Sin embargo, Ki-67 fue notablemente elevado con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1 coadministrado con GA-RG en magnitudes muy similares al porcentaje de expresión de granzima B que se observa en la Figura 1.

La Figura 3 muestra los resultados del marcador de proliferación Ki-67 en células T CD4+ para los diferentes grupos de animales experimentales. Hay pocos cambios en la proliferación de células CD4+ después del tratamiento solo con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1 o en combinación con GM. Sin embargo, Ki-67 fue notablemente elevado con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1 coadministrado con GA-RG en magnitudes muy similares a las observadas en las células CD8+ (Figura 2).

La Figura 4 muestra los resultados del crecimiento tumoral en los diferentes grupos experimentales. Cuando se añadió el tratamiento GA-RG al tratamiento con aCTLA4 o aPD-1, hubo una reducción significativa del crecimiento tumoral en comparación con la terapia con los anticuerpos solos.

Los resultados de estos experimentos demuestran que cuando los ratones se tratan con aOX40, aCTLA-4 o aPD-1 en combinación con GA-RG, hay un marcado aumento en la proliferación y activación de las células T citotóxicas CD8+, un aumento en la proliferación de células reguladoras T CD4+, y una disminución en el tamaño del tumor.

EJEMPLO 2: Mejora de la respuesta inmunitarias del tumor de próstata después del tratamiento conjunto con anti-cTLA4 o anti-oX40 en combinación con GA-RG

En este ejemplo, se realizaron experimentos en un modelo singénico de cáncer de ratón. Las células tumorales usadas fueron de la línea celular TRAMP-C1 que se derivó de un cáncer de próstata de ratón, como se describió en el Ejemplo 1.

El ejemplo incluye seis grupos de tratamiento de ratones inoculados con tumor con dos grupos en cada uno de los siguientes: ratones de control tratados con IgG con y sin GARG (1,2 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación; ratones tratados con aOX40 (250 microgramos o mcg) con y sin GA-RG (1,2 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación; y ratones tratados con aCTLA4 (200 mcg) los días 4, 6, 8, 11, 13 y 15 después de la inoculación, con y sin GA-RG (1,2 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación.

La Figura 5 muestra los resultados de estos tratamientos sobre el tamaño del tumor en diversos momentos después de la inoculación. Si bien el tratamiento con aOX40, aCTLA4 y GA-RG solo tuvo un efecto mínimo sobre el tamaño de los tumores, las combinaciones de aOX40 y aCTLA4 con GA-RG tuvieron un efecto mucho mayor en la disminución del tamaño del tumor en cada punto de tiempo señalado hasta el día 33 después de la inoculación tumoral.

La Figura 6 muestra las curvas de supervivencia para los ratones en los seis grupos de tratamiento. Los grupos tratados con la combinación de aOX40 y aCTLA4 con GA-RG tuvieron una duplicación de la supervivencia.

Los resultados de estos experimentos demuestran que cuando los ratones se trataron con aOX40 o aCTLA-4 en combinación con GA-RG, hubo una reducción significativamente mayor de los tumores de próstata que con los fármacos solos y un aumento en la supervivencia. El veinte por ciento de los ratones tratados con la combinación de aOX40 o aCTLA4 tuvieron supervivencias durante 100 días, mientras que todos los ratones tratados con cualquiera de los fármacos solos murieron a los 58 días.

EJEMPLO 3: Mejora de la respuesta inmunitaria del tumor de mama después del tratamiento conjunto con anti-cTLA4 o anti-oX40 en combinación con GA-RG

En este ejemplo, se realizaron experimentos en un modelo singénico de cáncer de mama de ratón. Las células tumorales usadas fueron de 4T1, que es una línea celular de cáncer de mama singénico derivada de un tumor mamario BALB/c que surge espontáneamente. Cuando se introduce ortotópicamente, la línea 4T1 crece rápidamente en el sitio primario y forma metástasis en los pulmones, el hígado, los huesos y el cerebro durante un período de 3-6 semanas. Cuando se introduce a través de la vena de la cola o arterialmente, las metástasis son evidentes en estos mismos órganos después de 1-2 semanas. La metástasis rápida y eficiente a los órganos afectados en el cáncer de mama humano hace que el modelo 4T1 sea un excelente modelo de ratón para el estudio de la progresión metastásica del cáncer de mama en seres

humanos. Debido a que el modelo es singénico en ratones BALB/c, puede usarse para estudiar la función del sistema inmunitario en el crecimiento tumoral y la metástasis. Para el modelo tumoral en estos experimentos, se inocularon células 4T1 (5×10^4 células) en ratones C57BL/6 normales mediante inyección subcutánea.

5 El ejemplo incluye seis grupos de tratamiento de ratones inoculados con tumor con dos grupos en cada uno de los siguientes: ratones de control tratados con IgG con y sin GARG (1,2 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación; ratones tratados con aOX40 (250 mcg) con y sin GA-RG (1,2 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación; y ratones tratados con aCTLA4 (200 mcg) en los días 4, 6, 8, 11, 13 y 15 después de la inoculación con y sin GA-RG (1,2 mg/dosis) los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación.

10 La Figura 7 muestra los resultados de estos tratamientos sobre el tamaño del tumor en varios momentos después de la inoculación. Si bien el tratamiento con aOX40, aCTLA4 y GA-RG solo tuvo algún efecto sobre el tamaño de los tumores, las combinaciones de aOX40 y aCTLA4 con GA-RG tuvieron un efecto mucho mayor en la disminución del tamaño del tumor en cada punto de tiempo señalado hasta el día 25 después inoculación tumoral.

15 Los resultados de estos experimentos demuestran que cuando los ratones se tratan con aOX40 o aCTLA-4 en combinación con GA-RG, hay una reducción significativamente mayor de los tumores de mama que con los fármacos solos y un aumento de la supervivencia.

20 EJEMPLO 4: Mejora de la supervivencia y reducción de la metástasis pulmonar después del tratamiento conjunto con anti-oX40 en combinación con GA-RG

En este ejemplo, se realizaron experimentos en un modelo singénico de cáncer de mama de ratón mediante el uso de células 4T1.

25 El ejemplo incluye cuatro grupos de tratamiento de ratones inoculados con tumor con dos grupos en cada uno de los siguientes: ratones de control tratados con IgG con y sin GARG (2,4 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación; y ratones tratados con aOX40 (250 mcg) con y sin GA-RG (2,4 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación.

30 Como se muestra en la Figura 8A, los ratones tratados con la combinación de aOX40 y GA-RG tuvieron una mayor supervivencia que los ratones tratados solo con aOX-40.

35 El número de metástasis pulmonares se evaluó en los animales mediante el uso de un ensayo clonagénico que evalúa el número de clones celulares independientes que crecen fuera del pulmón homogeneizado. Como se muestra en la Figura 8B, hubo una reducción de 10 veces en el número de metástasis pulmonares en los ratones tratados con la combinación de aOX40 y GA-RG que los ratones tratados solo con aOX-40.

40 Estos resultados muestran que los ratones tratados con la combinación de aOX40 y GA-RG tuvieron una mayor supervivencia que los ratones tratados solo con aOX-40 y que este efecto puede estar relacionado en parte con una reducción de la enfermedad metastásica.

EJEMPLO 5: Alteración de las poblaciones de monocitos

45 En este ejemplo, se realizaron experimentos en un modelo singénico de cáncer de mama de ratón mediante el uso de células 4T-1.

50 El ejemplo incluye cuatro grupos de tratamiento de ratones inoculados con tumor con dos grupos en cada uno de los siguientes: ratones de control tratados con IgG con y sin GARG (2,4 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación; y ratones tratados con aOX40 (250 mcg) con y sin GA-RG (2,4 mg/dosis) en los días 4, 8, 11 y 15 después de la inoculación.

55 Como se muestra en la Figura 9A, el porcentaje de células GR-1 negativas/CD11b positivas aumentó en la circulación de animales tratados con la combinación de aOX-40 y GA-RG (etiquetado como MD02 en este gráfico)

En contraste, el número de células GR-1 intermedias/CD11b positivas se redujo recíprocamente en animales tratados con la combinación de aOX40 y GA-RG (marcado como MD02 en este gráfico).

60 La elevación en las células positivas para GR-1 neg/CD11b es una indicación de un aumento en las células mononucleares de tipo no supresor que se asocia con una menor supresión de las células inmunitarias que podría asociarse con un efecto terapéutico sobre el tumor.

65 Estos resultados sugieren además que el fenotipo de células mononucleares/macrófagos puede verse alterado en la circulación y el microambiente tumoral en ratones que padecen de tumor con la terapia de combinación.

EJEMPLO 6: Mejora de la eficacia en tumores MCA205, una línea celular de tumor de sarcoma, después del tratamiento conjunto con anti-OX40 en combinación con GA-RG

5 En este ejemplo, se realizaron experimentos en un modelo singénico de cáncer de sarcoma de ratón mediante el uso de células MCA205.

10 El ejemplo incluye cuatro grupos de tratamiento de ratones inoculados con tumor con dos grupos en cada uno de los siguientes: ratones de control tratados con IgG (250 mcg; días 4, 8) con y sin GA-RG (2,4 mg/dosis) en los días 4, 6, 8, 11, 13 y 15 después de la inoculación; y ratones tratados con aOX40 (250 mcg; días 4, 8) con y sin GA-RG (2,4 mg/dosis) los días 4, 6, 8, 11, 13 y 15 después de la inoculación.

15 La Figura 10A muestra una disminución marcada en el tamaño del tumor con el tiempo cuando se administra aOX40 en combinación con GA-RG (etiquetado como GR-MD-02 en esta figura) con muy poco crecimiento tumoral en los animales tratados con la combinación.

La Figura 10B muestra curvas de supervivencia de los animales. Hubo una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia en los animales que recibieron aOX40 en combinación con GA-RG (etiquetado como GR-MD-02 en esta figura).

20 Esto demuestra que se observa un efecto similar con las células tumorales de sarcoma que con las células de cáncer de próstata y de mama, y en algunos aspectos el efecto es más robusto que en esos modelos tumorales.

EJEMPLO 7: Expresión de galectina-3 en líneas celulares tumorales

25 La expresión de galectina-3 se evaluó en líneas celulares tumorales usadas en estos experimentos, así como también en otras líneas celulares tumorales.

30 La Figura 11A muestra que había cantidades significativas de proteína galectina-3 secretada en los medios de cultivo por múltiples líneas celulares, con baja o nula secreción en las líneas celulares NOP-17 y SCN. Notablemente, dos de las líneas celulares que se usaron en los ejemplos anteriores, 4T1 y TRAMP-C1, secretaron grandes cantidades de galectina-3. Estos datos muestran que existen diferentes niveles de expresión de galectina-3 en líneas celulares que pueden estar relacionados con la eficacia del fármaco.

35 La Figura 11B muestra que había cantidades significativas de proteína galectina-3 en los lisados celulares completos de múltiples líneas celulares, con bajas cantidades en las líneas celulares NOP-17 y SCN. Notablemente, tres de las líneas celulares que se usaron en los ejemplos anteriores, 4T1, TRAMP-C1 y MCA-205, expresaron grandes cantidades de galectina-3.

40 Es de destacar que la línea celular que expresó la mayor cantidad de galectina-3, MCA-205 (Figura 11B), fue la más sensible a la terapia de combinación con aOX40 y GA-RG (Ejemplo 6).

Estos resultados sugieren además que la respuesta de los tumores a la terapia de combinación con GA-RG se correlaciona con el nivel de expresión de galectina-3.

45 EJEMPLO 8: Doble papel de galectina-3 en la activación de células T

50 La inmunosupresión y la función citolítica reducida de los linfocitos infiltrantes de tumores son los principales obstáculos para crear terapias eficaces para los pacientes. La galectina-3, un miembro de la familia de la lectina, se expresa en numerosos tipos de cánceres, que incluyen los de mama y próstata. Además, se expresa de forma ubicua por los epitelios de la próstata, los macrófagos y los linfocitos activados.

La galectina-3 endógena promueve la activación alternativa de macrófagos y limita la activación de células T CD4 mediada por TCR que limita la inmunidad antitumoral.

55 Dado que los efectos reguladores de la galectina-3 sobre la inflamación y la función de las células T CD8 se mantienen desconocidos, se realizaron experimentos para examinar este problema.

60 Se presume que la galectina-3 dentro del microambiente tumoral promueve la progresión tumoral al regular negativamente la función de las células T CD8. Para probar esto, se examinaron los efectos de la delección endógena de galectina-3 en las células T CD8.

In vivo, las células T Gal3-/CD8- específicas de antígeno exhibieron una función efectora disminuida (proliferación disminuida, granzima B, IFN-gamma e IL-2) en comparación con los controles de tipo salvaje (WT).

El análisis de la expresión génica diferencial en células T Gal3^{-/-} o Gal3^{+/+} CD8 específicas de antígeno encontró que la expresión del gen granzima B, CD25, KLRG-1 y Blimp-1 se redujo en células T Gal3^{-/-} CD8 en comparación a los controles.

5 Los estudios in vitro demostraron que las células T Gal3^{-/-}/CD8- específicas de antígeno tenían una reducción significativa en la expresión de CD25 y OX40. Estos datos sugieren un hallazgo nuevo y sorprendente, concretamente, que la galectina-3 tiene una función importante en la promoción de la función de las células T CD8, en contraste con su papel inhibidor en la función CD4.

10 Para evaluar el papel de la galectina 3 en el microambiente tumoral, se examinó la expresión de galectina 3 dentro del tumor mediante el uso del modelo TRAMP de carcinoma de próstata. La galectina 3 se expresó en macrófagos y células cancerosas dentro del tumor.

15 La inhibición de la galectina 3 con GA-RG (GR-MD-02) aumentó in vivo la expansión de células T CD8 y la expresión de CD62L, lo que sugiere funciones duales para Gal3 en la función de células T CD8.

20 La Figura 12 muestra la comparación del fenotipo entre las células T CD8 deficientes en Galectina-3 indiferenciadas y las células T CD8 de tipo salvaje (WT) mediante citometría de flujo. La Figura 12A muestra la expresión basal de marcadores fenotípicos en CD8 y CD4 indiferenciadas en ratones WT, Gal3^{-/-} WTOT-1-, or Gal3^{-/-}OT-1- se evaluó en esplenocitos no tratados. Para CD8 y CD4, el porcentaje de expresión enumerado es el porcentaje de células vivas que expresan CD8 o CD4. La Figura 12B muestra el modelo: los ratones C57BL/6 de tipo salvaje recibieron 3x10⁶ células T WT o Gal3^{-/-}OT-1- CD8 (iv) en el día 1. Las células T OT-1 de donantes se estimularon con 500 mcg de OVA soluble (sq; d0).

25 La Figura 13 muestra que las células T CD8 deficientes en galectina-3 exhiben una función efectora reducida después de la estimulación con antígeno in vivo. Las Figuras 13A-C muestran el fenotipo de las células T OT-1 donantes en el bazo que se determinó por citometría de flujo el día 7 después de la estimulación. Los gráficos representan la media de ratones individuales (n=4/grupo) de 1 de 3 experimentos independientes (* P <0,05; ** P <0,01).

30 La Figura 14 muestra que los genes seleccionados están regulados negativamente en las células T CD8 deficientes en Galectina. Las células T OT-1 de tipo salvaje o Gal3^{-/-} se transfirieron adoptivamente a huéspedes de tipo salvaje y después se estimularon con OVA. Cuatro días después, se recogieron los ganglios linfáticos y se purificaron las células T CD8 del donante mediante clasificación celular. Se extrajo el ARN de estas células y se evaluaron los cambios en la expresión génica mediante el uso de microarreglos de ADN de Affymetrix. La Figura 14A muestra una representación gráfica de diversos genes que se encuentran regulados negativamente en Gal3^{-/-}OT-1- respecto a WT. La Figura 14B muestra las unidades relativas y el cambio de la proporción para genes seleccionados.

35 La Figura 15 muestra que las células T CD8 deficientes en galectina tienen una expresión reducida de CD25 y OX40 después de la estimulación con antígeno. In vitro, las células dendríticas DC2.4 de tipo salvaje indiferenciadas o CD8 Gal3^{-/-}OT-1- purificadas se estimularon con pulsos de péptidos (ya sea 5 o 0,0005 microgramos/ml) con o sin IL-2 (100 ng/ml). Las células se cosecharon a las 48 o 72 horas más tarde para examinar la expresión de CD25 (IL-2Ra) u OX40 por citometría de flujo.

40 La Figura 16 muestra que la inhibición de galectina-3 aumenta la función efectora de células T CD8. Los ratones C57BL/6 de tipo salvaje recibieron 3x10⁶ células T CD8 WT OT-1 indiferenciadas (iv) el día 1. Donante de células T OT-1. Inhibidor de Gal-3, GR-MD-02 (un GA-RG particular) (barras blancas) (sq; d0, 1). Los días siete (Figura 16A) o 29 (Figura 16B) después, el fenotipo de las células donantes en la sangre periférica o el bazo, respectivamente, se determinó por citometría de flujo. No hubo diferencias entre los grupos para la expresión de Ki-67, Granzima B o KLRG-1.

45 La Figura 17 muestra que la inhibición de galectina-3 con GA-RG (GR-MD-02) aumenta la expansión de células T CD8 cuando se usa en combinación con anti-CTLA-4 en esplenocitos aislados en el día 29 como se describió anteriormente.

Estos estudios muestran que la deficiencia endógena de galectina-3 disminuyó la proliferación y activación de las células T CD8 en respuesta al antígeno y disminuyó la producción de citocinas.

50 Las células T CD8 deficientes en galectina-3 tienen KLRG, CD25, IFN γ , granzima B y FasL reducidos, los cuales están todos aumentados en las efectoras CD8.

55 Las células T CD8 deficientes en galectina-3 han reducido la expresión de CD25 y OX40 in vitro. La expresión de CD25 puede rescatarse mediante la adición de IL-2, mientras que la expresión de OX40 no puede rescatarse mediante la adición de IL-2.

60 La inhibición de la galectina-3 in vivo mediante el uso de GA-RG (también llamada GR-MD-02) mejora la proliferación y activación de las células T CD8 en respuesta al antígeno.

Por lo tanto, parece que la inhibición de la galectina-3 con un inhibidor que actúa sustancial o exclusivamente en el compartimento extracelular tiene efectos diferentes a la falta total de galectina-3 producida endógenamente en las células T.

- 5 Si bien esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a modalidades preferidas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles en las mismas sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para usar en la administración parenteral en el tratamiento del cáncer de un sujeto que lo necesita, en donde la composición está en un portador farmacéutico aceptable y comprende:
 - a. una cantidad terapéuticamente eficaz de un galactoarabino-ramnogalacturonato que comprende un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4 y galacturonato de metilo (MeGalA) unidos a heteropolímeros ramificados de oligómeros alternos de residuos de ramnosa unida por α -1,2 y α GalA unido por α -1,4, los residuos de ramnosa que portan una ramificación primaria de oligómeros de residuos de 1,4- β -D-galactosa, residuos de 1,5- α -L-arabinosa, o una combinación de 1,4- β -D -galactosa y 1,5- α -L-arabinosa, y en donde el esqueleto de los residuos de ácido galacturónico unido por 1,4 y galacturonato de metilo representa entre 55 a 85 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el heteropolímero ramificado de residuos alternos de ramnosa unida por α -1,2 y GalA unido por α -1,4 representan entre 1 y 6 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el oligómero 1,4- β -D-galactosa de la ramificación primaria representa entre 6 y 15 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales y el oligómero de 1,4- α -L-arabinosa de la ramificación primaria representa entre 2 y 8 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, según se **caracteriza por** cromatografía de gases/espectrometría de masas, y en donde el galactoarabino-ramnogalacturonato tiene un peso molecular promedio que varía de 20 kDa a 70 kDa; y
 - b. una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, en donde el anticuerpo es un anti OX40/OX40L, anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti PD-L1, anti PD-L2, anti 4-1B /4-1BBL, anti-CD27, anti-CD70 o una combinación de cualquiera de los anteriores.
2. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anti-OX40.
3. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anti-OX40, un anti-CTL-4, un anti-PD-1, un anti-PD-L1 y un anti PD-L2 o combinación de cualquiera de los anteriores.
4. La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anti-OX40, un anti-CTLA-4, un anti-PD-1 o una combinación de los anteriores.
5. La composición para usar de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en donde el galactoarabino-ramnogalacturonato comprende además residuos de xilosa, glucosa, fucosa o una combinación de los mismos.
6. Una composición que comprende
 - a. una cantidad terapéuticamente eficaz de un galactoarabino-ramnogalacturonato que comprende un esqueleto de residuos de ácido galacturónico (GalA) unido por 1,4 y galacturonato de metilo (MeGalA) unidos a heteropolímeros ramificados de oligómeros de residuos alternos de ramnosa unida por α -1,2 y GalA unido por α -1,4, los residuos de ramnosa que portan una ramificación primaria de oligómeros de residuos de 1,4- β -D-galactosa, residuos de 1,5- α -L-arabinosa, o una combinación de residuos de 1,4- β -D-galactosa y 1,5- α -L-arabinosa, y en donde el esqueleto de residuos de ácido galacturónico unido por 1,4 y de galacturonato de metilo representa entre 55 a 85 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el heteropolímero ramificado de residuos alternos de ramnosa unida por α -1,2 y GalA unido por α -1,4 representa entre 1 y 6 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, el oligómero 1,4- β -D-galactosa de la ramificación primaria representa entre 6 y 15 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales y el oligómero de 1,5- α -L-arabinosa de la ramificación primaria representa entre 2 y 8 por ciento molar del contenido molar de carbohidratos totales, según se **caracteriza por** cromatografía de gases/espectrometría de masas, y en donde el galactoarabino-ramnogalacturonato tiene un peso molecular promedio que varía de 20 kDa a 70 kDa; y
 - b. una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, en donde el anticuerpo es un anti OX40/OX40L, anti-CTLA-4, anti-PD-1, anti PD-L1, anti PD-L2, anti 4-1BB/4-1BBL, anti-CD27, anti-CD70 o una combinación de cualquiera de los anteriores; y
 - c. un portador farmacéuticamente aceptable.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo es un anti-OX40.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anti-OX40, un anti-CTL-4, un anti-PD-1, un anti-PD-L1 y un anti PD-L2 o combinación de cualquiera de los anteriores.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anti-OX40, un anti-CTLA-4, un anti-PD-1 o una combinación de los anteriores.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el galactoarabino-ramnogalacturonato comprende además residuos de xilosa, glucosa, fucosa o una combinación de los mismos.

Figura 1

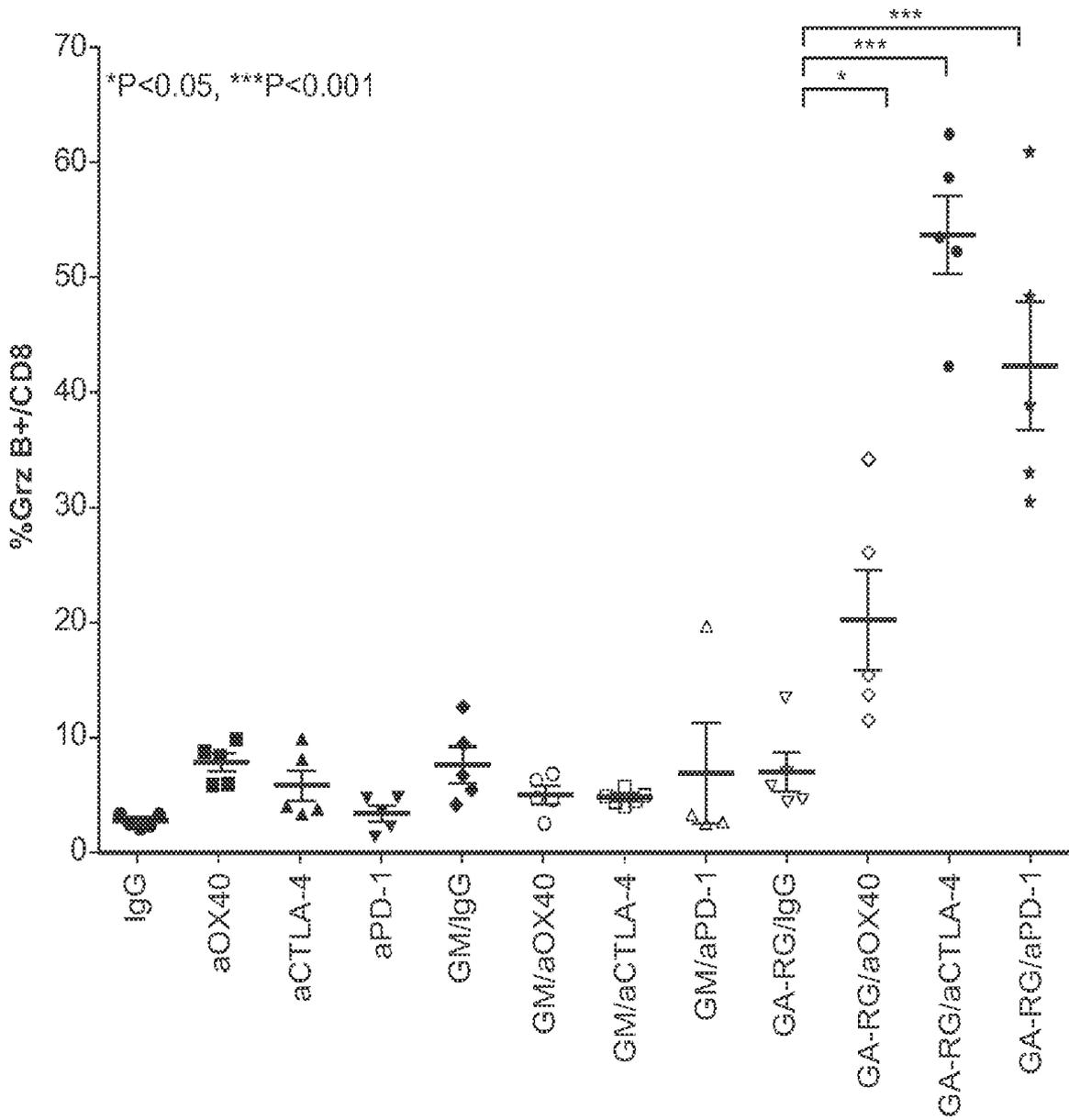


Figura 2

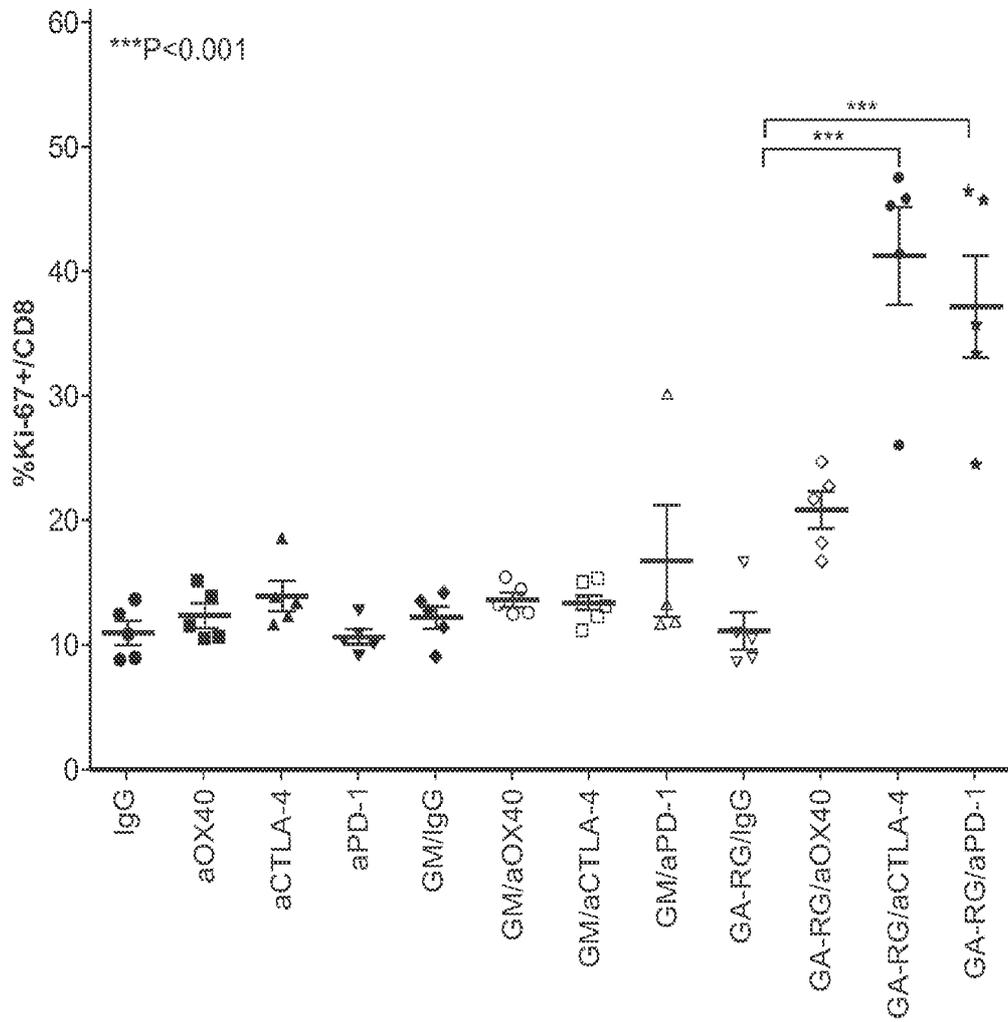


Figura 3

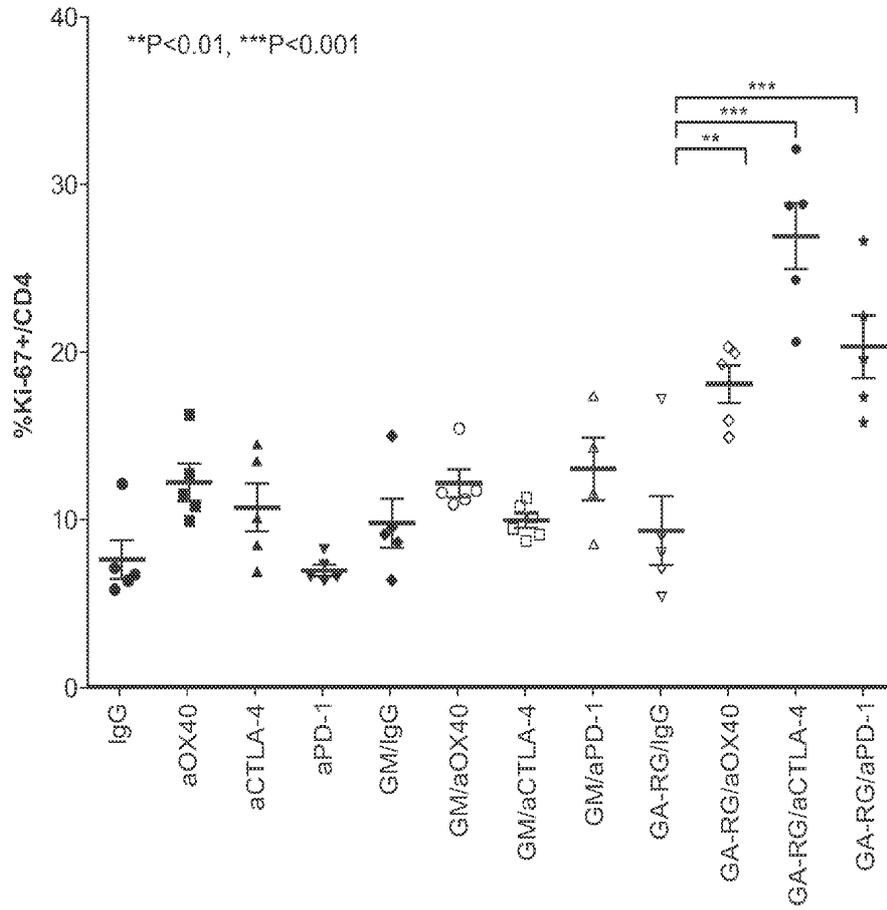


Figura 4

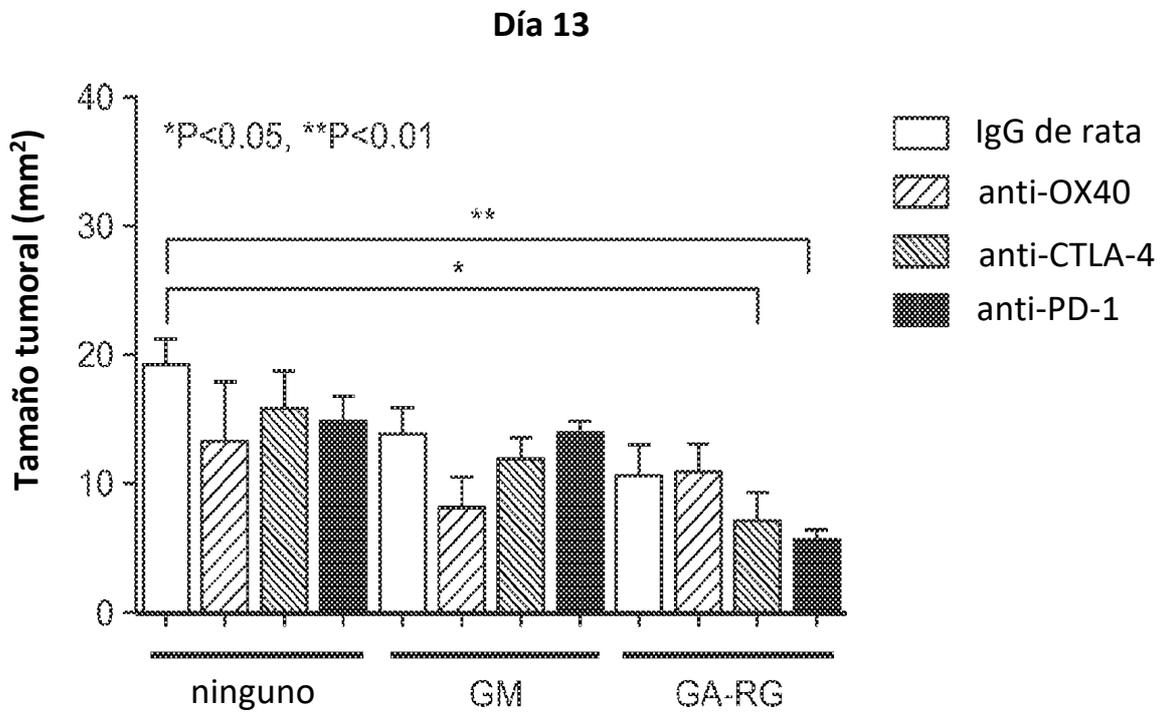


Figura 5

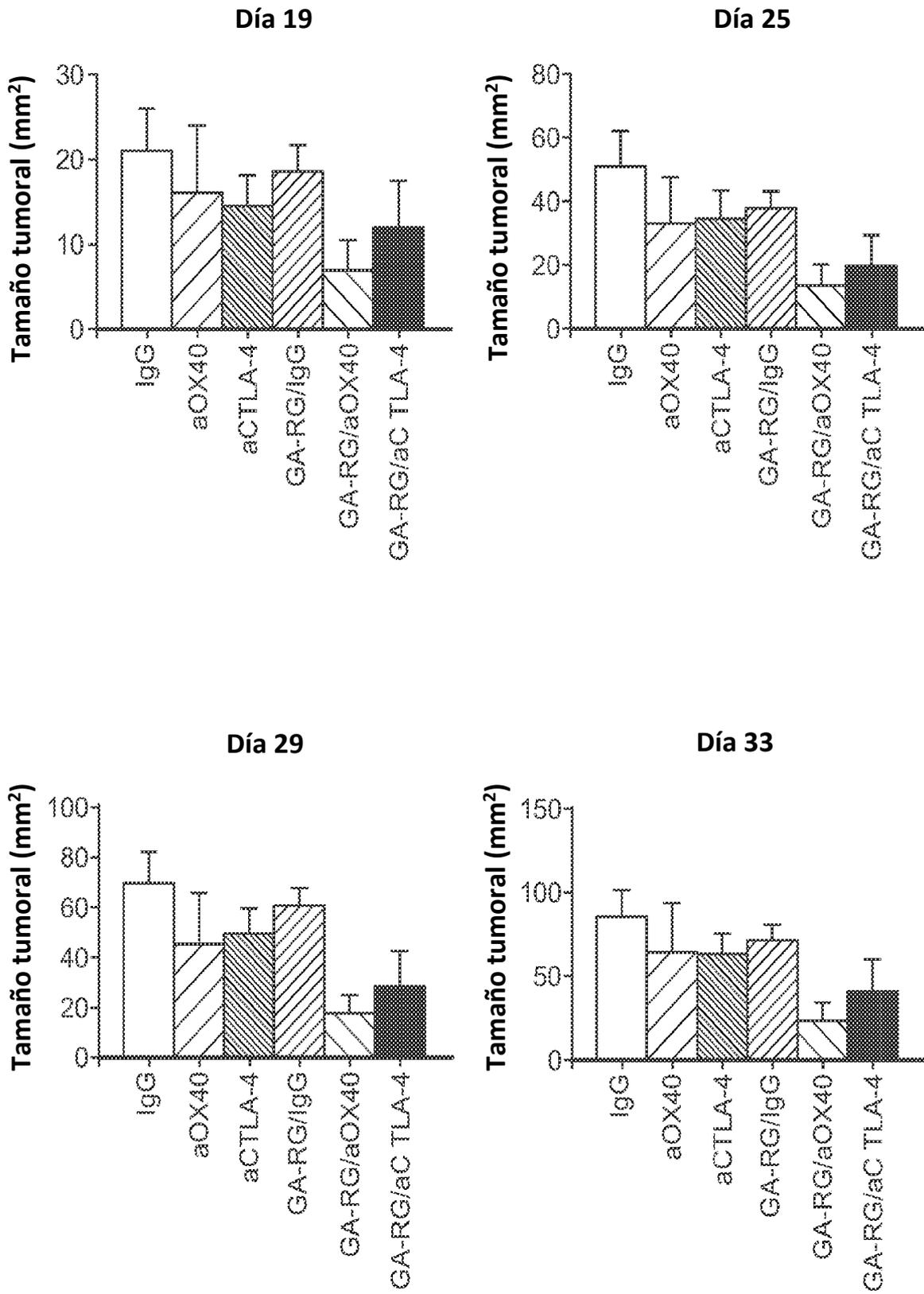


Figura 6

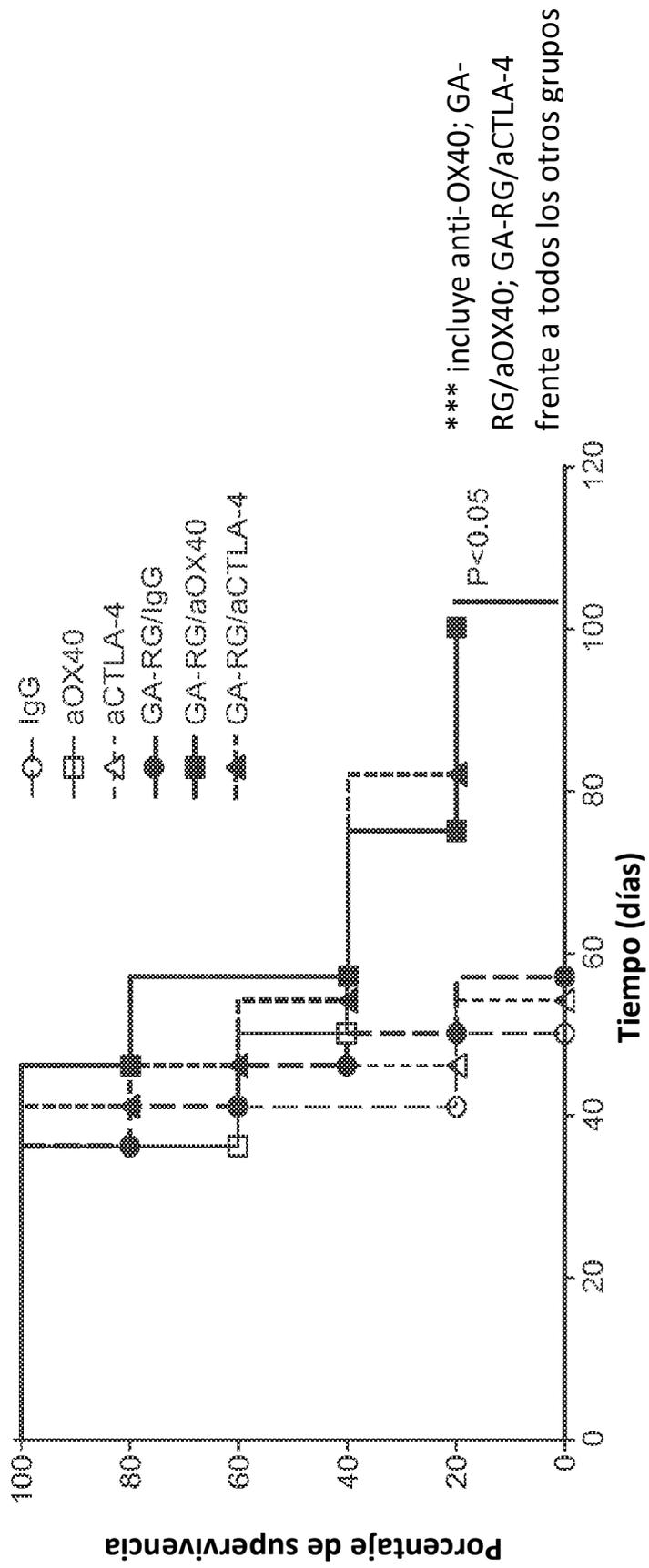
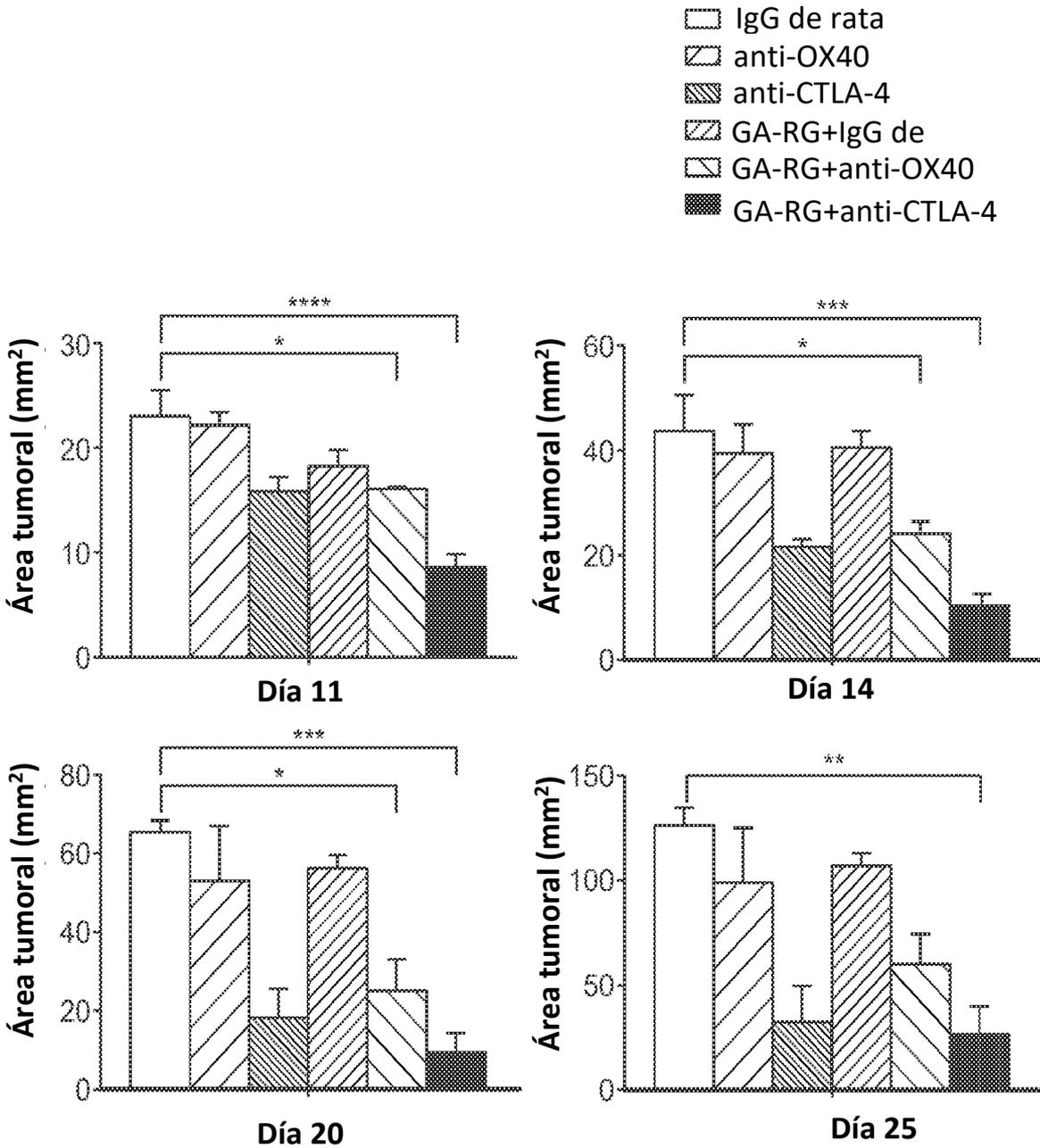


Figura 7

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001

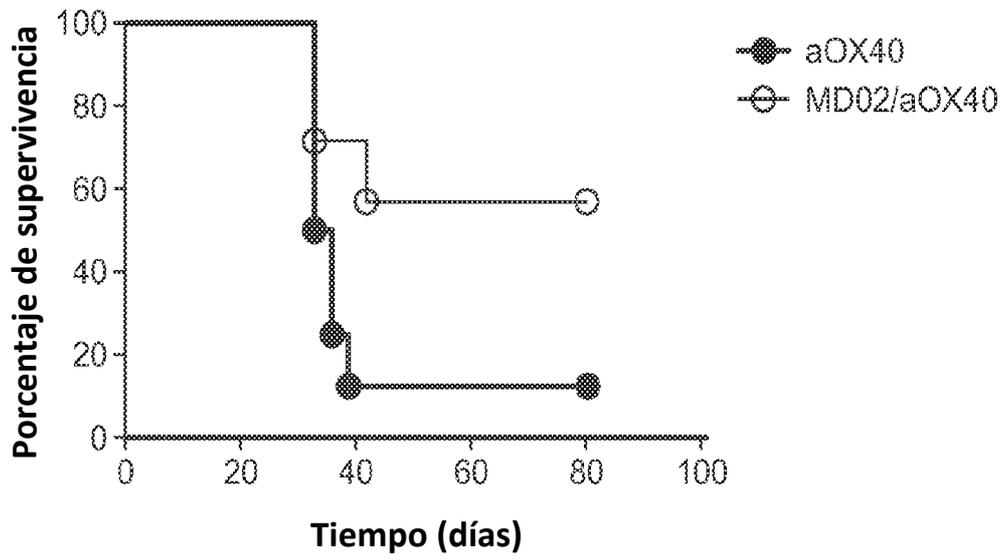


*** GA-RG+anti-CTLA-4 es P <0,05 frente a todos los grupos en el día 11

*** GA-RG+anti-CTLA-4 también es P <0,05 frente a GA-RG+IgG de rata en todos los puntos de tiempo

Figura 8

A



B

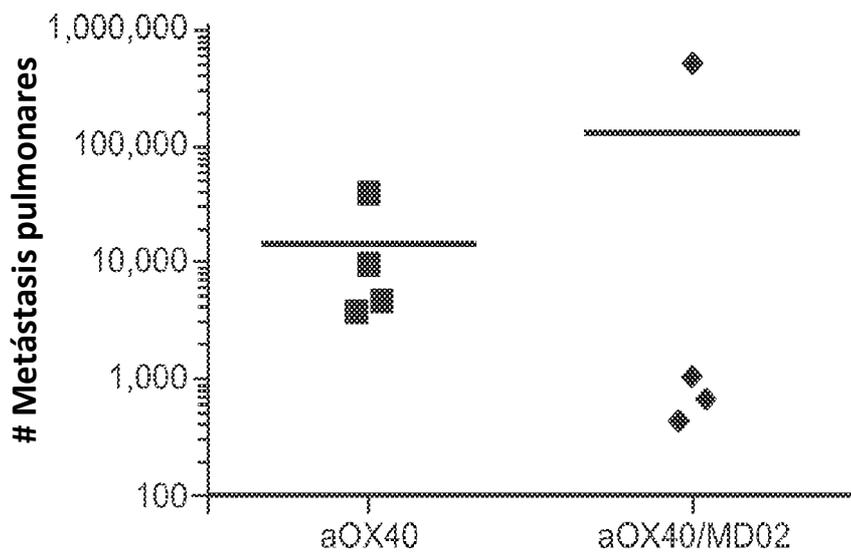
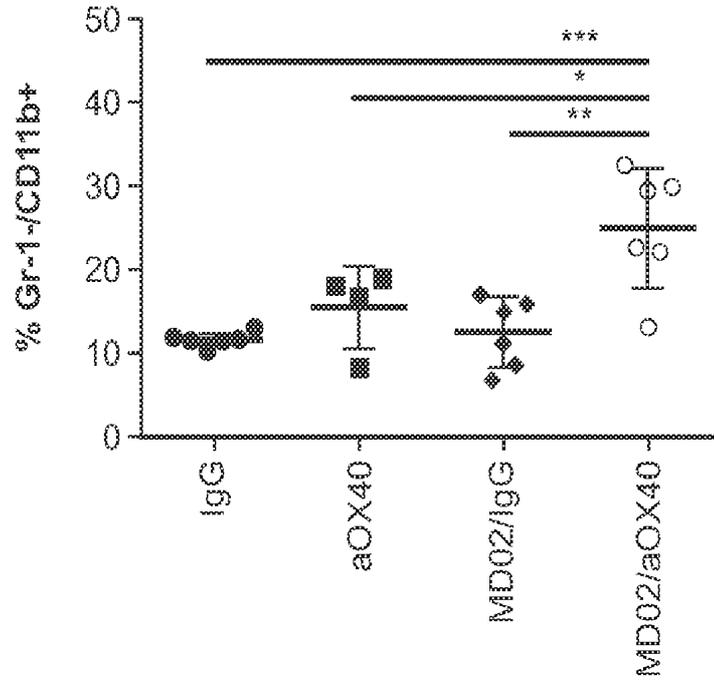


Figura 9

A



B

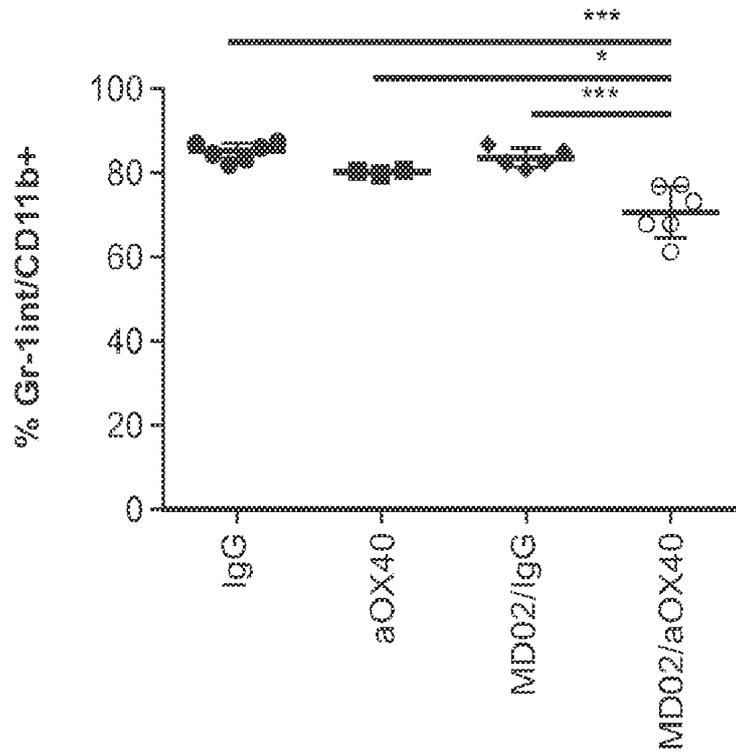


Figura 10A

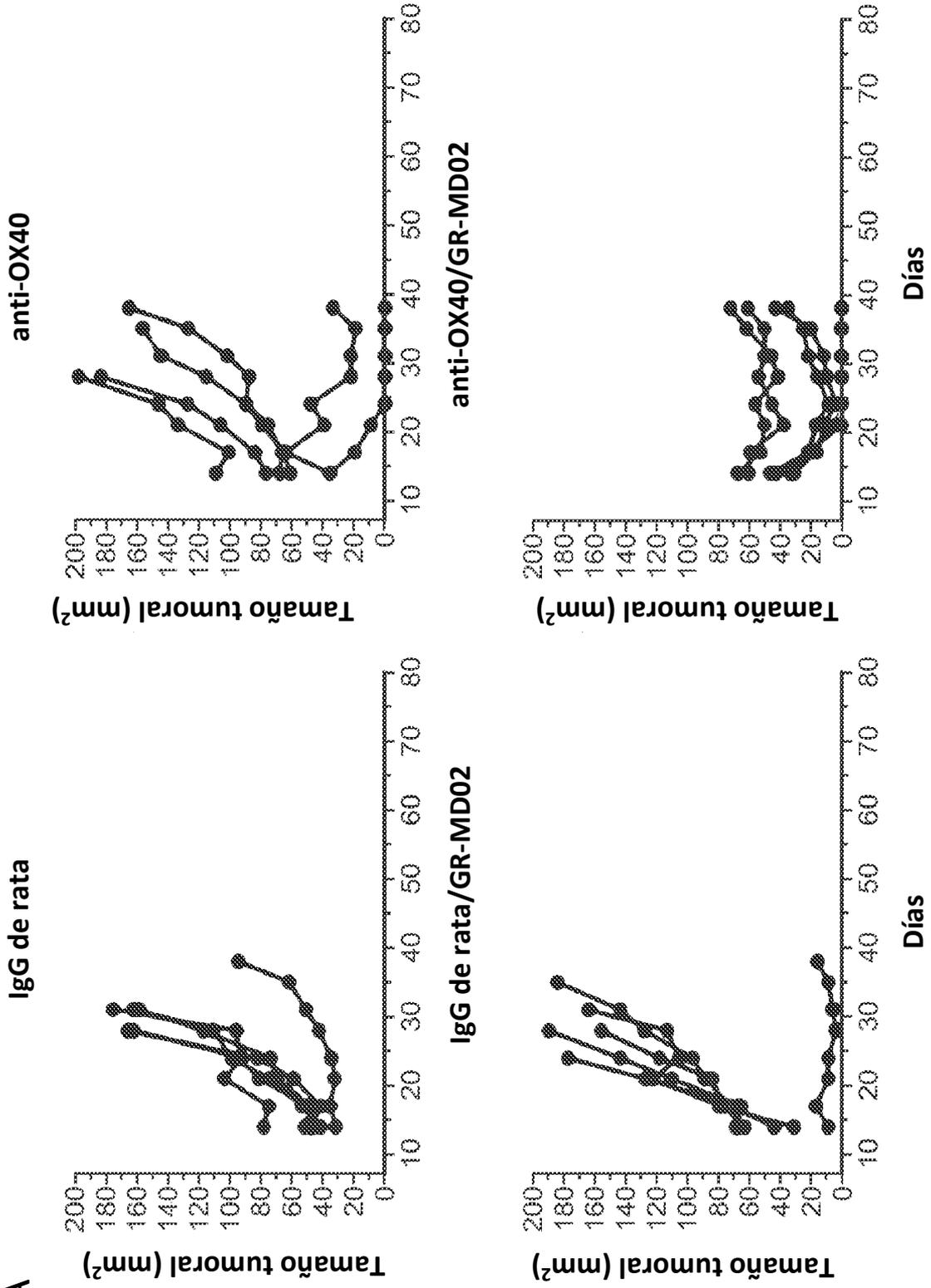


Figura 10B

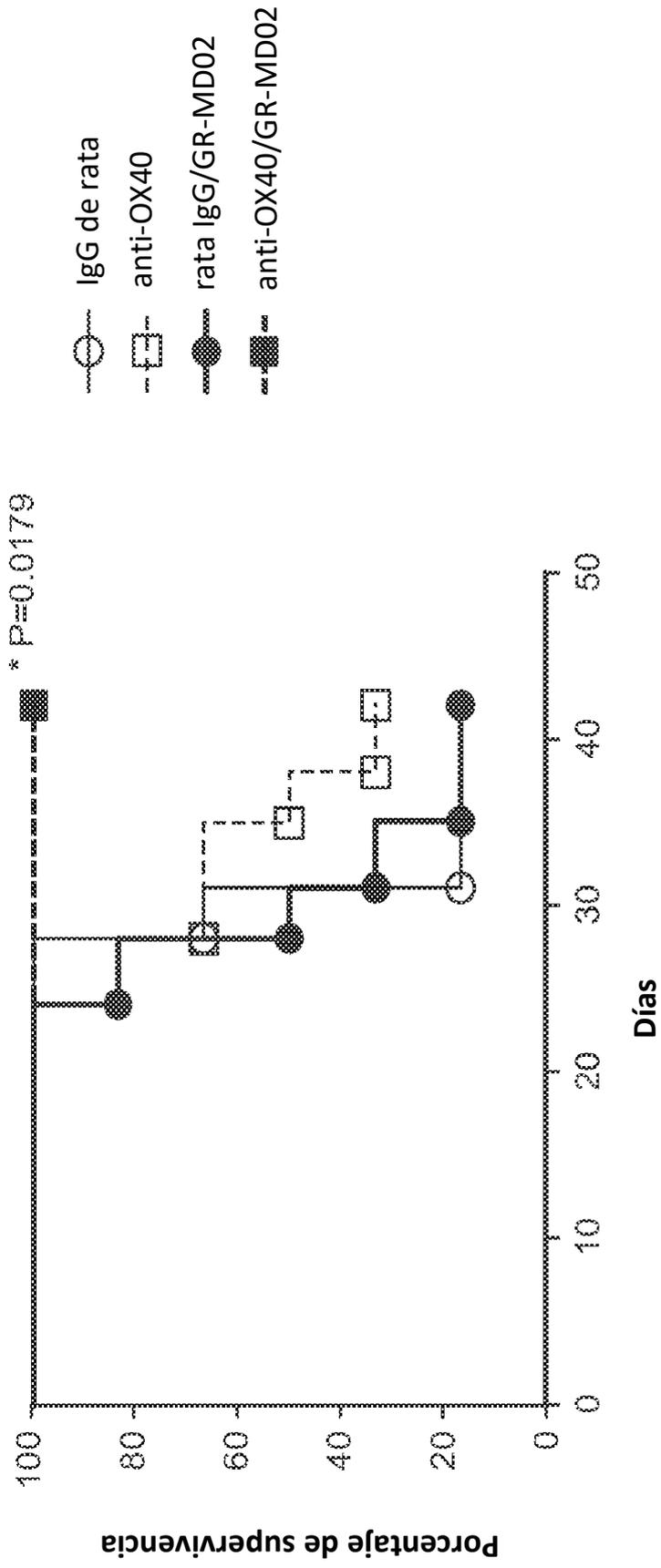
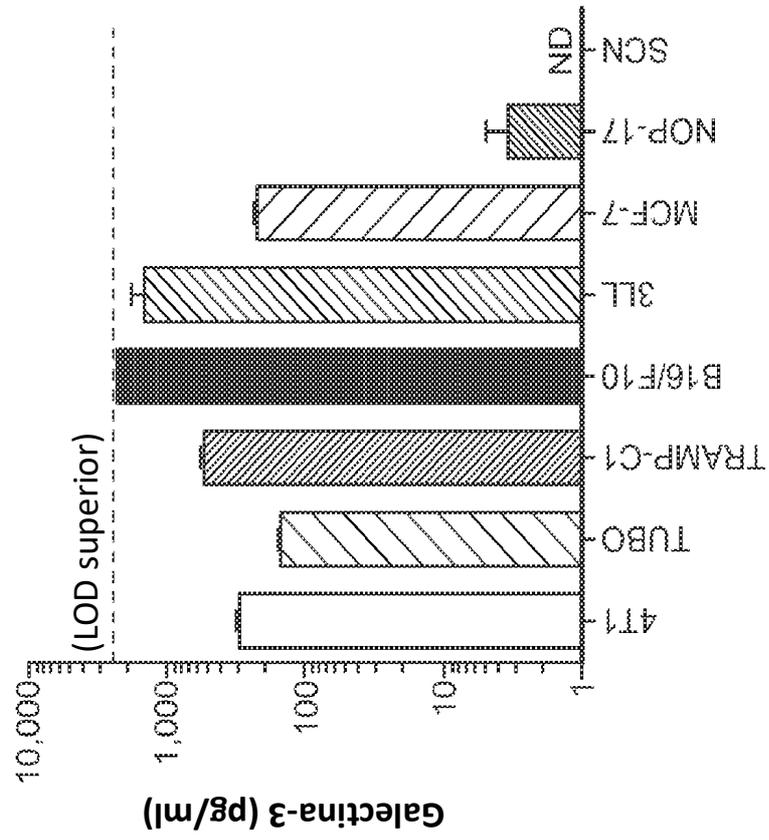


Figura 11

A

Gal-3 Secretada; ELISA; 24 h de cultivo



B

Transferencia Western; lisado de células enteras

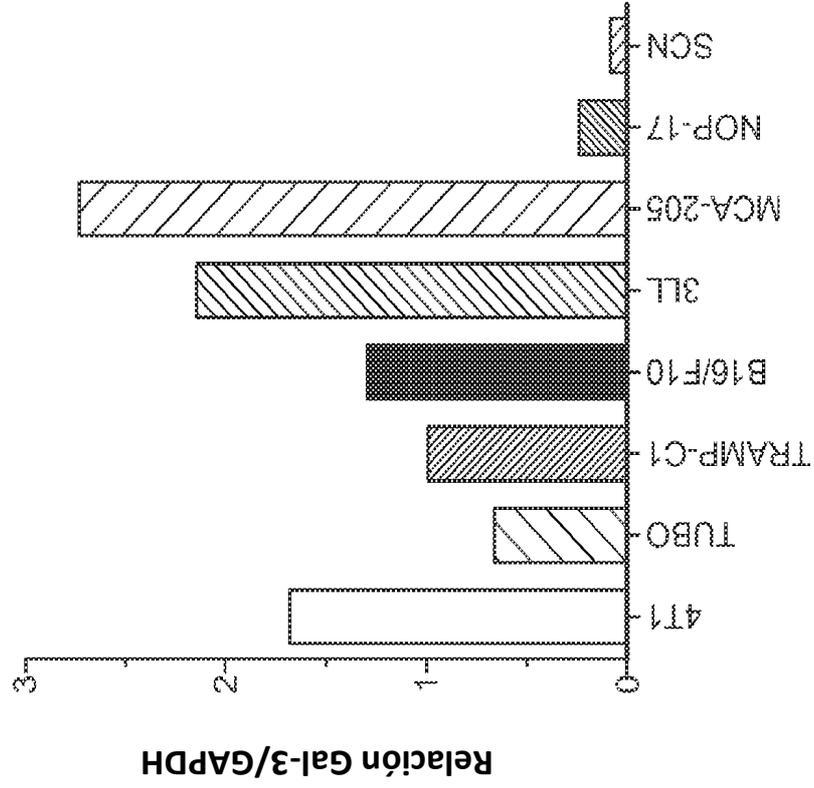


Figura 12

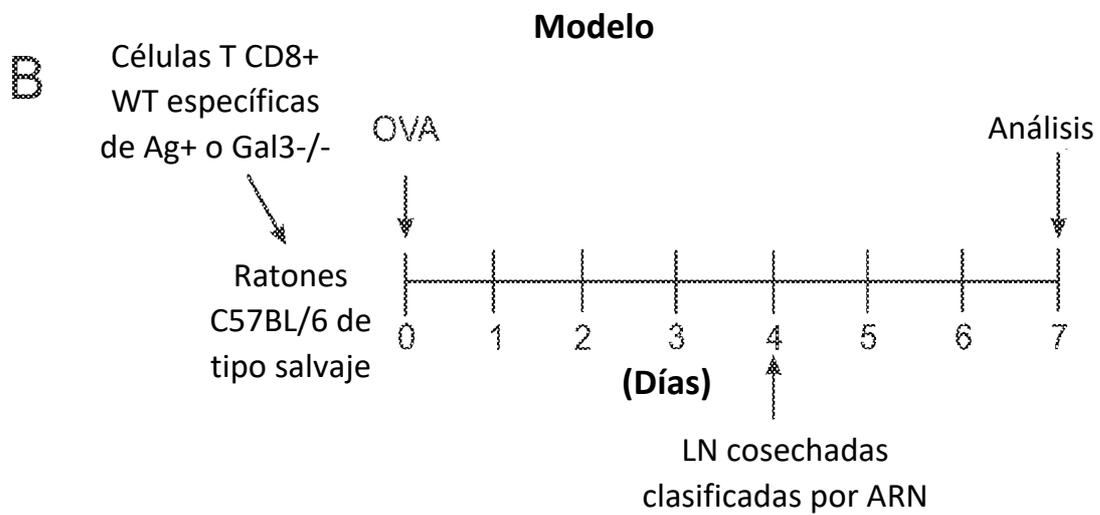
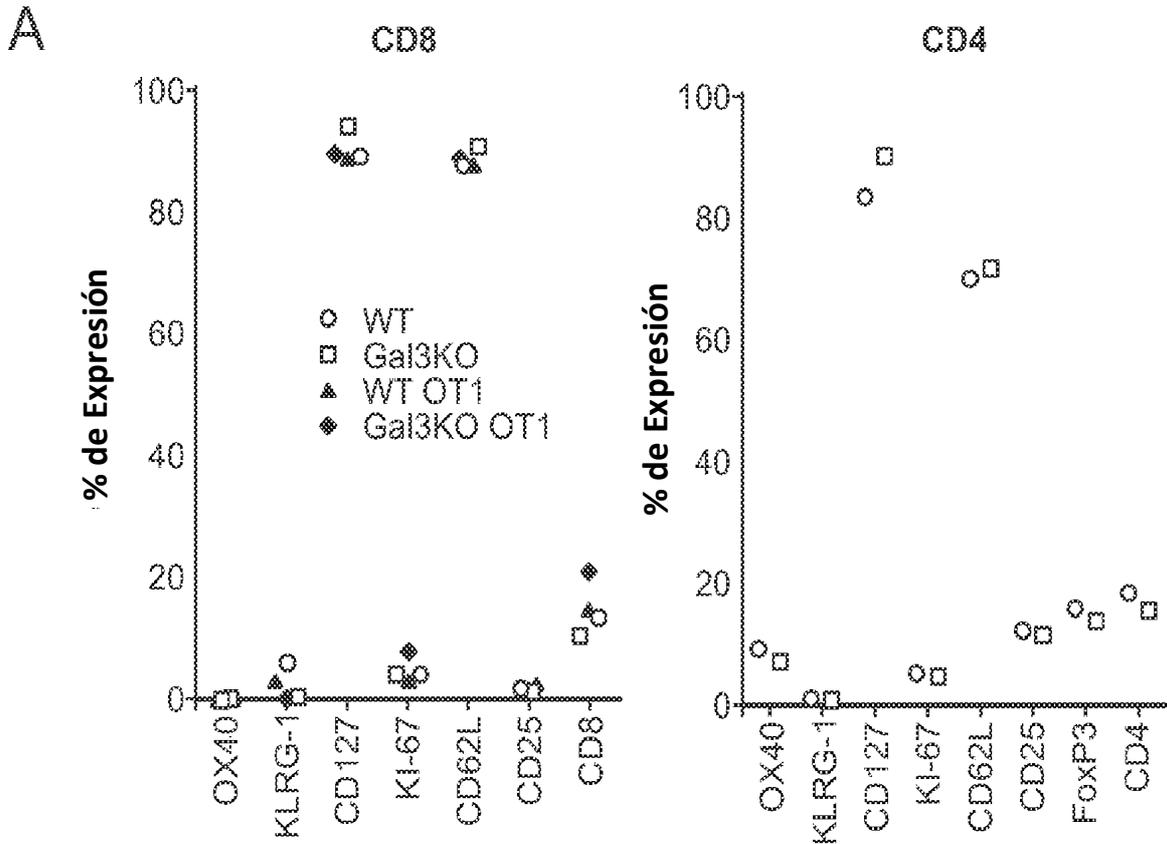


Figura 13

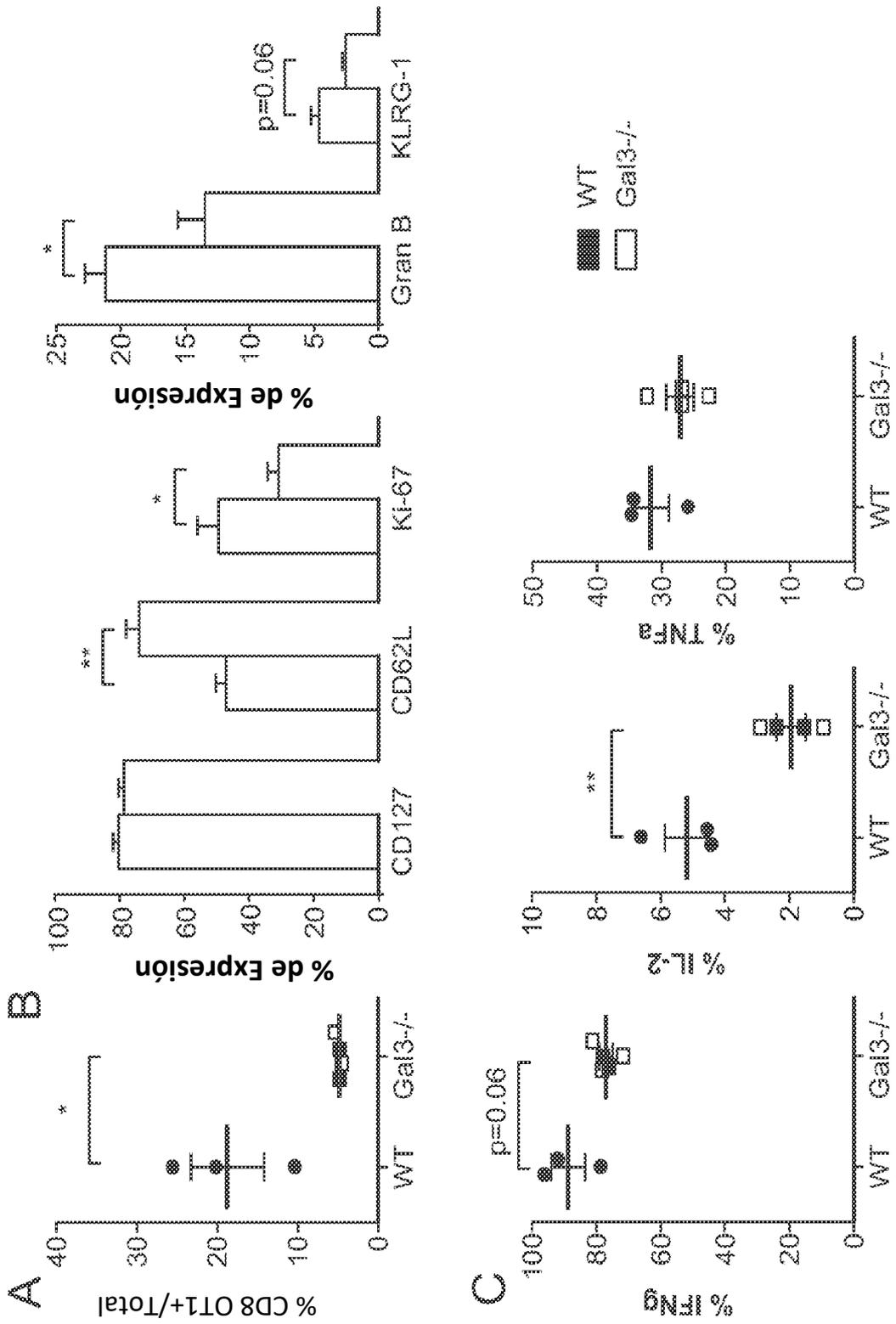
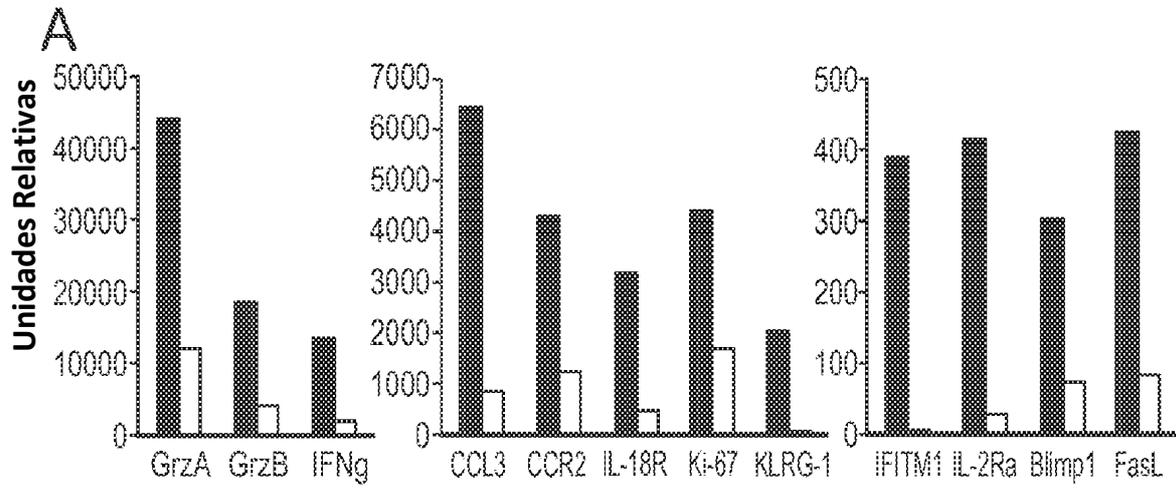


Figura 14



B

	Gen	WT (unidades relativas)	Gal3 ^{-/-} (unidades relativas)	Cambio de la proporción
Disminución en Gal3^{-/-}	Granzima A	44146	11948	-4
	Granzima B	18561	4111	-5
	IFNg	13477	1991	-7
	CCL3	6415	853	-8
	CCR2	4300	1214	-4
	IL-18R	3178	508	-6
	Ki-67	4380	1680	-3
	KLRG-1	2072	15	-138
	IFITM1	392	5	-84
	IL-2Ra (CD25)	415	28	-15
	Blimp1	304	73	-4
	FasL	423	82	-5

Figura 15

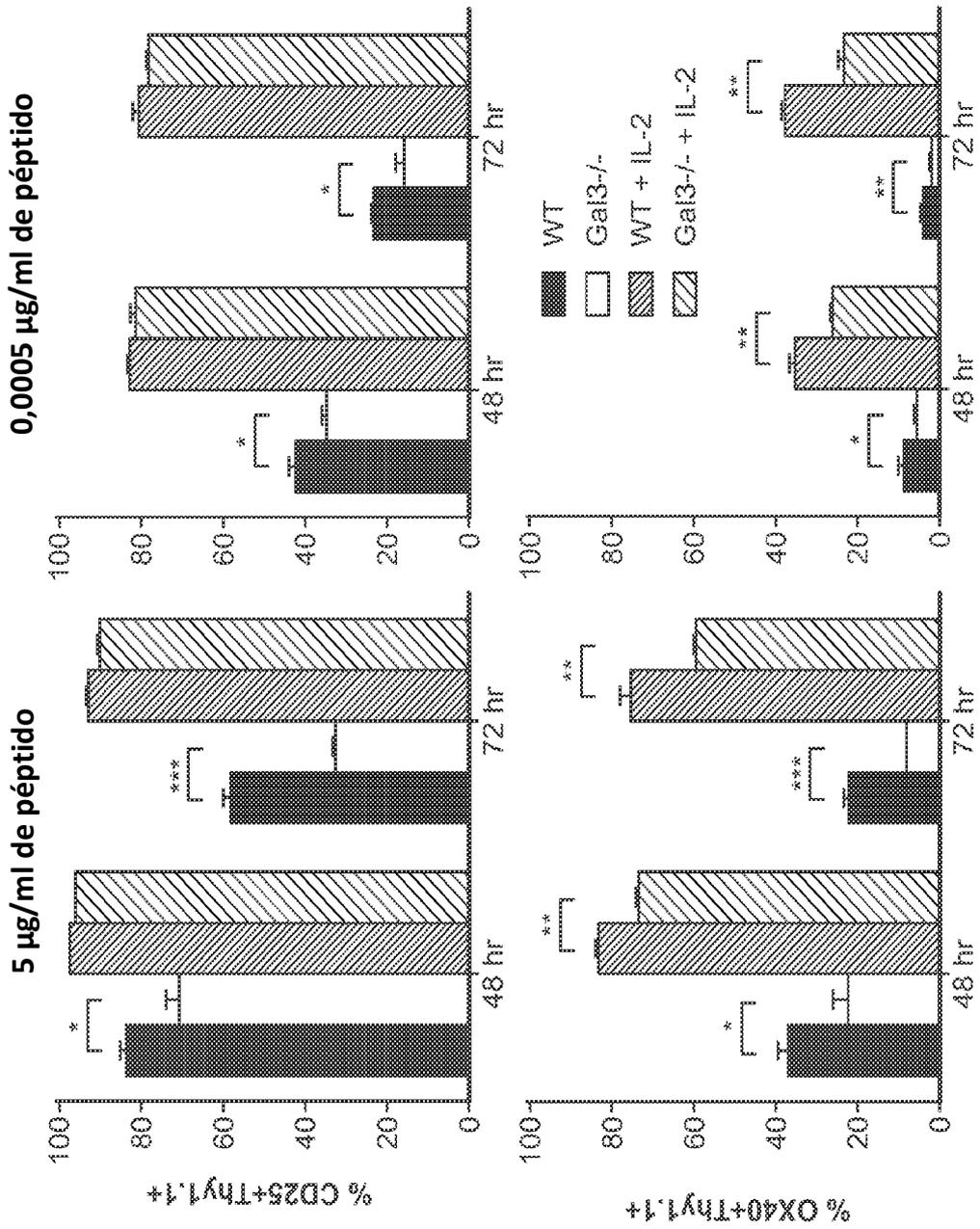


Figura 16

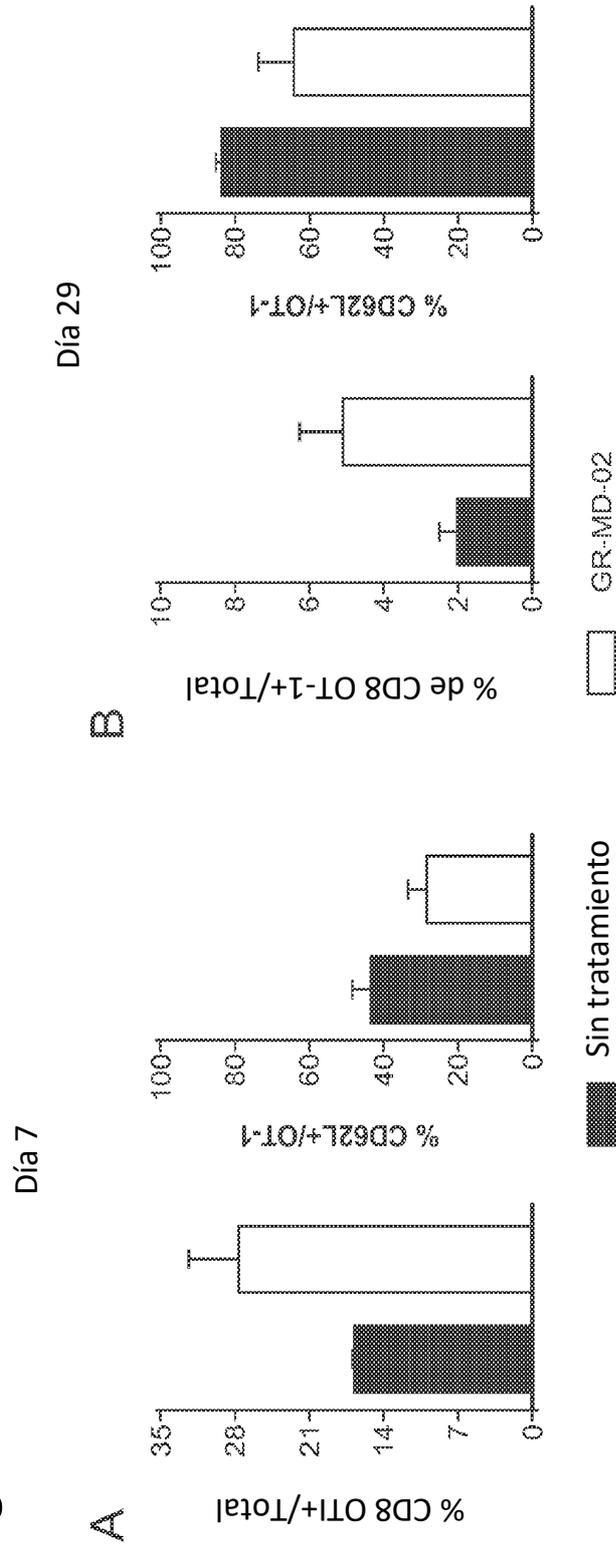


Figura 17

