

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 673**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2015 PCT/US2015/066400**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16100679**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2015 E 15871075 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3233104**

54 Título: **Tratamientos y composiciones de inmunoterapia**

30 Prioridad:

19.12.2014 US 201462094944 P

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

04.09.2020

73 Titular/es:

**SUSAVION BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
1615 W. University Drive, Suite 132
Tempe, AZ 85281, US**

72 Inventor/es:

**EGGINK, LAURA L. y
HOOBER, J. KENNETH**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 781 673 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

Tratamientos y composiciones de inmunoterapia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden un péptido que activa la respuesta inmunológica y a métodos de uso de las composiciones para inmunoterapia, incluyendo el tratamiento del cáncer.

10 **Antecedentes de la invención**

En los vertebrados, el sistema inmunológico comprende el sistema inmunológico innato y el sistema inmunológico adaptativo. Mientras que la respuesta inmunológica innata reconoce patógenos de forma no específica, por ejemplo, a través de patrones moleculares asociados a patrones que distinguen a los patógenos de las moléculas del hospedador, el sistema inmunológico adaptativo se dirige a antígenos específicos. La especificidad de la respuesta inmunológica adaptativa se adquiere mediante la interacción con los antígenos, que se presentan como un complejo con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a células inmunitarias adaptativas. Varios subgrupos de células T pueden activarse por la presentación del antígeno.

La interacción de la célula T virgen con el complejo MHC requiere interacción con CD4 o CD8 además de la unión del antígeno por el receptor de la célula T (TCR). El MHC de clase I puede expresarse en casi todas las células con núcleo del cuerpo e interactúa con CD8, que se expresa predominantemente en el tipo citotóxico de las células T. Estas células pueden inducir la muerte de las células que presentan el antígeno que dio lugar a la activación de la célula, por lo que están muy reguladas para prevenir el daño tisular. La activación de las células T citotóxicas requiere una señal intensa del complejo MHC o una activación adicional proporcionada por las células T colaboradoras. Las células T colaboradoras se caracterizan por la expresión de CD4, de forma que interactúan con el MHC de clase II. A pesar de que estas células no tienen la capacidad de matar a las células portadoras del antígeno que ocasionó su activación, estas células controlan la respuesta inmunológica desencadenada por el antígeno. La activación de células T colaboradoras vírgenes provoca la liberación de citocinas que pueden activar células presentadoras de antígenos o activar células T citotóxicas. Por ejemplo, las células T colaboradoras Th1 o Th2 mejoran la respuesta inmunológica a diferentes tipos de antígenos. Una respuesta Th1, que se caracteriza por la liberación de interferón- γ (IFN γ), conduce a la activación de fagocitos, células T citotóxicas, y a la liberación de varias citocinas en respuesta a un antígeno. Una respuesta Th2, que se caracteriza por la liberación de interleucina-4 (IL-4), conduce a las respuestas mediadas por macromoléculas que se encuentran en fluidos extracelulares tales como anticuerpos secretados, proteínas del complemento y ciertos péptidos antimicrobianos.

El sistema inmunológico también establece una supresión inmunológica para limitar el potencial dañino de una respuesta inmunológica. La subpoblación de células T reguladoras inmunosupresoras de células T atenúa una respuesta citotóxica de las células T, y normalmente protege contra la sobreestimulación y el desarrollo de autoinmunidad. Incluso antes de la diferenciación en células T vírgenes, un grupo de precursores de células T se diferencian en células T reguladoras naturales en el timo mediante una interacción moderada con el complejo MHC autopéptido. Las células T reguladoras también incluyen células T reguladoras inducibles desarrolladas a partir de células T CD4⁺ fuera del timo. Mientras que las células T reguladoras naturales suprimen la activación de las células T por interacción con las células presentadoras de antígenos para producir señales negativas para la activación de las células T, las células T reguladoras inducibles producen citocinas que inhiben la proliferación de células T.

El desequilibrio entre la respuesta inmunológica activa y la supresora puede dar lugar a enfermedades y afecciones tales como el cáncer, inmunodeficiencia (por ejemplo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida), enfermedades autoinmunitarias o reacciones de hipersensibilidad o puede hacer que empeoren enfermedades e infecciones, por ejemplo, tuberculosis, Leishmania o malaria.

Así como las células inmunes patrullan el cuerpo en busca de peligros potenciales, las células inmunitarias también eliminan los tumores. Una respuesta inmunológica anticancerosa fuerte requiere anticuerpos (el brazo humoral, adaptativo) y un brazo mediado por células activas. La interacción entre estos dos brazos está controlada por la activación de las células dendríticas (el tipo celular principal de células presentadoras de antígenos, APC) y la consecuente producción de anticuerpos por parte de las células B. La destrucción de las células cancerosas se produce entonces por dos procesos: una respuesta celular citotóxica por parte de neutrófilos, linfocitos citolíticos naturales, células T citotóxicas y macrófagos, y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) realizada por macrófagos activados y neutrófilos. A menudo, las células tumorales pueden hacerse más susceptibles a la digestión para la presentación de antígenos mediante un tratamiento de radiación o de quimioterapia. La activación de estas células proporciona un enfoque múltiple que debe superar la supresión inmunológica o "evasión de la destrucción inmunológica", un indicativo importante de cáncer [Hanahan y Weinberg, 2011]. Mientras que Hanahan y Weinberg apoyan la "teoría de la mutación somática" para el origen del cáncer, Sonnenschein et al. (2014) proporcionaron una propuesta alternativa de que el cáncer es el resultado de un fallo de la organización tisular, o la "teoría del campo de la organización del tejido".

Un logro de la inmunoterapia es restaurar la capacidad del sistema inmunológico para superar estas enfermedades. Las dianas de la inmunoterapia tradicional han sido antígenos específicos de las células diana, tales como antígenos asociados a tumores (por ejemplo, el antígeno T_n o el antígeno T_f) o grupos de glicosilación expresados en la superficie de virus o bacterias o en células infectadas por virus o bacterias. Por ejemplo, las vacunas que usan estos antígenos inducen la producción endógena de anticuerpos contra estos antígenos para desencadenar una respuesta inmunológica. El enfoque tradicional también usa adyuvantes para ayudar a la estimulación del sistema inmunológico, pero una mayor comprensión de las respuestas inmunológicas ha ampliado los posibles candidatos para los factores que activan las células inmunitarias para estimular el sistema inmunológico, ya sea directa o indirectamente para desencadenar una respuesta inmunológica. La comprensión de los puntos de control inmunológicos ha permitido que la inmunoterapia se dirija a proteínas que participan en la regulación del equilibrio de la respuesta inmunológica, por ejemplo, para suprimir o aumentar la población de células T reguladoras. Por tanto, la inmunoterapia es ahora capaz de 1) inducir la producción endógena de anticuerpos, 2) proporcionar anticuerpos exógenos que manipulan el tipo de respuesta inmunológica a desencadenar y 3) activar o suprimir células inmunológicas específicas por factores del punto de control del sistema inmunológico.

El documento WO2013/096829 divulga polipéptidos para imitar azúcares que se unen a receptores de la superficie celular de lectina de tipo C y su uso para tratar el glioblastoma multiforme.

La presente invención esta dirigida a combinaciones de estos enfoques para mejorar la inmunoterapia, por ejemplo, para aumentar la inmunogenicidad de tumores. En concreto, la presente invención está dirigida al uso de péptidos en combinación con anticuerpos, tales como anticuerpos exógenos contra proteínas de punto de control inmunológico o contra marcadores de cáncer. Los péptidos que imitan a azúcares y se unen a los receptores reguladores de tipo lectina expresados por las células clave del sistema inmunológico pueden mejorar las respuestas inmunológicas, lo cual puede apoyar los beneficios terapéuticos de los anticuerpos exógenos.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido y un primer anticuerpo, en donde el péptido tiene una secuencia activa representada por la SEQ ID NO:1, y el anticuerpo es contra una proteína de punto de control inmunológico seleccionada del grupo que consiste en: CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición para su uso en la activación de una respuesta inmunológica en un sujeto, en donde la composición comprende un péptido y un primer anticuerpo, en donde el péptido tiene una secuencia activa representada por la SEQ ID NO:1, y el primer anticuerpo es contra una proteína de punto control inmunológico seleccionada del grupo que consiste en: CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit para activar la respuesta inmunológica, que comprende: un péptido que tiene una secuencia activa representada por la SEQ ID NO:1; y un primer anticuerpo contra una proteína de punto de control inmunológico seleccionada del grupo que consiste en: CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2.

La SEQ ID NO: 1 (VQATQSNQHTPR) también se denomina en el presente documento "svL4"). El péptido puede ser tetravalente. Por ejemplo, el péptido tiene la estructura [(VQATQSNQHTPRGGGS)₂K]₂K-NH₂ (SEQ ID NO:3). En algunos aspectos, la composición farmacéutica, la composición para su uso y/o el kit pueden incluir un segundo anticuerpo, en donde el segundo anticuerpo es contra una proteína de punto de control inmunológico diferente de la del primer anticuerpo. Las realizaciones de la invención pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las proteínas del punto de control inmunológico se seleccionan de al menos uno de antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), muerte programada 1 (PDL-1) o ligandos de PD-1, tales como el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2).

La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para activar la respuesta inmunológica en un sujeto. En algunos aspectos, la cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad suficiente para tratar el cáncer en un sujeto. El cáncer puede ser cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de riñón o cáncer de piel, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata refractario a hormonas, carcinoma ovárico epitelial, adenocarcinoma de ovario, melanoma, mesotelioma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico o carcinoma de células renales.

En una realización, el péptido y el primer anticuerpo están en una cantidad suficiente para tratar las infecciones derivadas de virus, micobacterias o parásitos.

En algunas realizaciones, el péptido y el primer anticuerpo de la composición farmacéutica, composición para su uso o kit están en una cantidad suficiente para suprimir la población de células T reguladoras en los tumores. En otra realización, el péptido y el primer anticuerpo de la composición farmacéutica, composición para su uso o kit están en una cantidad suficiente para aumentar la población de células T efectoras. En otra realización más, el péptido y el primer anticuerpo de la composición farmacéutica, composición para su uso o kit están en una cantidad suficiente

para aumentar los niveles de por lo menos una citocina anticancerosa seleccionada del grupo que consiste en la IL-2, IL-12p70, IL-21, IL-27, TNF α e IFN γ . La divulgación establece que el nivel de citocinas anticancerosas puede aumentar varias veces. En una realización, la cantidad del péptido y la cantidad del primer anticuerpo en la composición farmacéutica, en la composición para su uso o en el kit están en cantidades terapéuticamente eficaces

- 5 suficientes para activar una respuesta inmunológica en un sujeto. La cantidad terapéutica del primer péptido y del segundo péptido puede estar entre aproximadamente 0,1 nmol/kg de peso corporal y aproximadamente 1500 nmol/kg de peso corporal, entre aproximadamente 1 nmol/kg de peso corporal y aproximadamente 1 000 nmol/kg de peso corporal, o aproximadamente 1 nmol/kg de peso corporal.
- 10 La presente divulgación proporciona además métodos para activar la respuesta inmunológica adaptativa en un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido a un sujeto, en donde el péptido tiene una secuencia peptídica activa representada por la SEQ ID NO:1; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, en donde el anticuerpo es contra una proteína de punto de control inmunológico. El anticuerpo puede comprender anticuerpos contra proteínas de puntos de control inmunológico de
- 15 dos rutas de punto de control inmunológico distintas. El péptido administrado puede ser tetravalente. La secuencia peptídica activa puede estar conectada al núcleo por una secuencia enlazadora. El núcleo puede ser un núcleo de tri-lisina, y la secuencia enlazadora puede ser -GGGS- (SEQ ID NO:2). Por ejemplo, un péptido tetravalente puede tener la estructura [(VQATQSNQHTPRG-GGS) $_2$ K] $_2$ K-NH $_2$ (SEQ ID NO:3).
- 20 El método puede comprender administrar el péptido antes de administrar el anticuerpo, por ejemplo, al menos tres días antes de la administración del anticuerpo. Después de esto, el péptido puede administrarse simultáneamente con la administración del anticuerpo. El péptido y el anticuerpo pueden administrarse juntos al comienzo del tratamiento. El péptido puede administrarse en días alternos o con periodicidad semanal. La administración del péptido puede continuar después del período de tratamiento con anticuerpos.

25

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa la estructura del svL4 tetravalente, presentándose la secuencia activa como SEQ ID NO:1 (VQATQSNQHTPR). A: Diseño esquemático del péptido. Los brazos con secuencias activas (1,2) están conectados mediante una secuencia espaciadora (3) a un núcleo de tri-lisina (4). B: Estructura química del péptido con una amida C-terminal. Los péptidos están compuestos en su totalidad por L-aminoácidos de origen natural, donde A es alanina, G es glicina, H es histidina, K es lisina, L es leucina, N es asparagina, P es prolina, Q es glutamina, R es arginina, S es serina, T es treonina y V es valina. La secuencia -GGGS- (SEQ ID NO:2) es un enlazador entre la secuencia activa de 12 unidades y el núcleo de tri-lisina. Por consiguiente, el svL4 tetravalente representado tiene la estructura [(VQATQSNQHTPRGGGS) $_2$ K] $_2$ K-NH $_2$ (SEQ ID NO:3).

- 30 La figura 2 representa un gráfico de svL4 por HPLC. La cromatografía se realizó mediante CBL con una columna C8 con un gradiente de acetonitrilo en un 0,1 % de TFA/agua. La pureza del péptido es > 95 %.
- 35 La figura 3 representa el espectro de masas de ionización por electroespray (ESI) de svL4. Se indica el estado de ionización del péptido para cada señal.

- 40 La figura 4 representa la elución de svL4 en una columna de CM-Sephadex C50. El svL4 se pasó a través de una columna de DEAE-Sephadex A25 en NaCl 25 mM. La concentración de NaCl se elevó entonces a 100 mM y la muestra se aplicó a la columna de CM-Sephadex. A partir de la fracción 24, la columna se lavó con 25 ml de NaCl 100 mM, luego con 50 ml de NaCl 200 mM y luego con NaCl 500 mM. Las fracciones (dilución 1:100) se examinaron mediante OD a 210 nm para el contenido de péptidos y a 405 nm para la endotoxina mediante el método de ensayo colorimétrico del lisado de *Limulus ameobocyte* (Lonza, Walkersville, MD, USA).

- 45 La figura 5 muestra la actividad de unión de svL4 a (de izquierda a derecha) CLEC10a, Langerina, ASGPR1, Dectina-1, CLEC9a, DCSIGN, CD44, IL-4R y Siglec-1.

- En la figura 6 se muestra el aumento en veces de las poblaciones con una tinción elevada para los marcadores en las células peritoneales de ratones C57BL/6 dosificados Q2D con 1 nmol/g de svL4. Los valores no tratados se normalizaron a 1.0 (barras grises) para mostrar el aumento en veces con la administración de svL4 (barras negras) y para comparar las respuestas entre los tipos celulares el día 3 del tratamiento.

- La figura 7 representa los aumentos en los tipos celulares peritoneales encontrados en los ratones C57BL/6 tratados con 1 nmol/g de svL4 en un experimento de transcurso de tiempo. Para cada tipo celular, las tres barras de cada grupo indican los datos del día 1, día 3 y día 5, es decir, un día después de cada inyección subcutánea el día 0, día 2 y día 4. Los números celulares de los macrófagos (F4/80 CD11b) se indican en el panel A, los macrófagos activados (F4/80 CD11b CD86) en el panel B, las DC (CD11c) en el panel C, las células NKT (NK1.1 CD3 $^+$) en el panel D, las células NKT activadas (NK1.1 CD3 $^+$ CD69) en el panel E, las células NK activadas (NK1.1 CD3 $^-$ CD69) en el panel F, las células Th activadas (CD4 CD69) en el panel G, las células T citotóxicas (CD8 CD69) en el panel H, las células B (CD19) en el panel I, y de las células B de memoria (CD19 CD73 CD80 CD273) en el panel J. Los datos se expresan como recuentos reales de células en los análisis.

- La figura 8 representa el porcentaje de células Treg en tumores de melanoma B16 disociados (A) y la relación entre células T efectoras y células T reguladoras en tumores (B). El svL4 se administró por vía subcutánea en días alternos a una dosis de 1,0 nmol/g de peso corporal. El anticuerpo contra la molécula-4 asociada a linfocitos T citotóxicos (α -CTLA-4) se inyectó por vía intraperitoneal cada tres días a una dosis de 100 μ g por animal. Las barras muestran los promedios de dos análisis de flujo.

- La figura 9 representa análisis de flujo de células tumorales de animales en los que se habían implantado células

de melanoma B16 y los tratamientos que cada animal recibió como se describe en la leyenda de la figura 8.

La figura 10 representa el tamaño tumoral el día 19 después de la implantación de células de glioma en el cerebro de ratones (A) y la supervivencia de los ratones en los que se habían implantado células de glioma en el cerebro (B). Se administró una dosis baja de radiación el día 7 y 9, seguida posteriormente de una inyección subcutánea de svL4 (1 nmol/g de peso corporal) en días alternos.

La figura 11 representa un estudio del efecto de la dosis de svL4, administrado por vía subcutánea en días alternos, sobre el tamaño tumoral en ratones en los que se habían implantado células de glioma en el cerebro. En este experimento el tratamiento fue solo con péptido. El tamaño tumoral se expresa como un porcentaje del tumor en ratones control no tratados.

La figura 12 representa el efecto del tratamiento en ratones en los que se había implantado una línea celular de cáncer de ovario. A: Peso corporal promedio de grupos de 8 ratones C57BL/6 tratados con 0,1 nmol/g de svL4 por vía subcutánea desde el día 45 hasta el día 98 (línea inferior) o no tratados (línea superior). La rápida disminución del peso corporal medio de los ratones control cerca del día 90 indicó la muerte de los animales. Curiosamente, cuando se terminó el tratamiento, la ascitis pareció aumentar. B: Curvas de supervivencia de ratones no tratados y tratados después de terminar el tratamiento el día 95. Mientras que todos los animales sin tratar murieron el día 129, cuatro de los ocho animales tratados estaban vivos el día 150 en el grupo de 0,1 nmol/g, que es 8 semanas después de la finalización del tratamiento.

La figura 13 representa una comparación de la supervivencia de perros con una diversidad de cánceres cuando se les trata con medicamentos quimioterapéuticos (enumerados) más svL4 o solo con svL4 después de la finalización de otros medicamentos. Se administraron inyecciones de 1 mg por vía intravenosa en un programa semanal.

Descripción detallada de la invención

El verbo "comprender", tal como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones y sus conjugaciones, se utiliza en su sentido no limitante para hacer referencia a que se incluyen los elementos que siguen a esta palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" no excluye la posibilidad de que estén presentes más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. Por tanto, el artículo indefinido "un" suele significar "al menos uno".

La expresión "respuesta inmunológica innata" o "inmunidad innata", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la respuesta de las células inmunitarias a una amenaza aguda por parte de un patógeno. Las respuestas suelen ser reacciones inherentes a factores de reconocimiento del patógeno.

La expresión "respuesta inmunológica adaptativa" o "inmunidad adaptativa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la respuesta de los linfocitos antígeno-específicos (por ejemplo, las células T y B) al antígeno, incluyendo el desarrollo de la memoria inmunológica. Las respuestas inmunológicas adaptativas se generan por la selección clonal de linfocitos.

La expresión "célula T efectora", tal como se usa en el presente documento, se refiere a las células T que pueden mediar en la eliminación de patógenos o células sin necesidad de una diferenciación adicional. Por tanto, las células T efectoras son distintas de las células T vírgenes y de las células T de memoria, que deben diferenciarse y a menudo proliferar antes de convertirse en células efectoras.

La expresión "célula T reguladora" o "célula Treg", tal como se usa en el presente documento, se refiere a las células T que inhiben las respuestas de las células T, particularmente mediante la supresión o la regulación negativa de la inducción o proliferación de células T efectoras. Por tanto, estas células pueden inducir tolerancia inmunológica. La expresión de al menos uno de CD25, CD39, CD73 y Foxp3 es indicativa de células T reguladoras. Aunque la mayoría de las células T reguladoras son CD4+, también pueden ser CD8+. Otro indicativo de células T reguladoras es la expresión elevada de la molécula-4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) o del receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR).

La expresión "punto de control inmunológico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una ruta inhibitoria en el sistema inmunológico que es crucial para mantener la autotolerancia y modular la duración y la amplitud de las respuestas inmunológicas fisiológicas en los tejidos periféricos a fin de reducir al mínimo los daños colaterales en los tejidos.

El término "inmunoterapia", tal como se usa en el presente documento, se refiere al tratamiento de una enfermedad o afección induciendo, aumentando o suprimiendo una respuesta inmunológica.

El término "patógeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cosa que pueda producir una enfermedad. Por tanto, el término incluye agentes infecciosos, tales como virus, bacterias, priones, hongos o protozoos, junto con células hospedadoras transformadas en células neoplásicas.

La presente invención se refiere a un enfoque de inmunoterapia de combinación para activar o mejorar la respuesta

inmunológica. Una respuesta inmunológica adaptativa óptima incluye la presencia de anticuerpos para marcar patógenos y componentes celulares activados, incluyendo a los macrófagos, células T citotóxicas, linfocitos citolíticos naturales y células dendríticas. La invención puede inhibir las respuestas inmunosupresoras, mejorar las respuestas de las células T efectoras, o ambas cosas. La eficacia de la función de las células T efectoras puede aumentar, por ejemplo, aumentando la proporción de células T efectoras y células T reguladoras dentro del tumor y el microambiente del tumor. La población de células T reguladoras dentro del tumor y en el microambiente del tumor puede suprimirse. El perfil de citocinas del sujeto puede alterarse para mejorar la eficacia de la función de las células T efectoras, por ejemplo, induciendo un aumento de varias veces de la IL-2, IL-12p70, IL-21, IL-27, TNF α e IFN γ en el suero. El aumento de los niveles séricos de estas citocinas puede producirse alrededor de las 4 horas siguientes a la administración de la terapia combinada.

Pueden tratarse enfermedades y afecciones en un sujeto en el que la respuesta inmunológica desencadenada por el sistema inmunológico del sujeto sin ayuda externa no es capaz de defender al sujeto contra la enfermedad o afección. Tales enfermedades y afecciones pueden ser cánceres e infecciones persistentes. En una realización, los cánceres que pueden tratarse por la invención son el cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de riñón o cáncer de piel. Idóneamente, los cánceres son adenocarcinoma colorrectal, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata refractario a hormonas, adenocarcinoma de ovario, carcinoma ovárico epitelial, melanoma, mesotelioma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico o carcinoma de células renales. Los ejemplos de infecciones persistentes incluyen infecciones virales, infecciones micobacterianas y parasitarias. La infección viral puede provocarse por un retrovirus, tal como HIV. En algunos La infección micobacteriana puede ser tuberculosis. La infección parasitaria puede ser Leishmania o malaria.

Péptidos de la terapia combinada

Un régimen de fondo "existente", no tóxico, sobre el que se puede potenciar la respuesta inmunológica deseada inducida por los agentes de la inmunoterapia (por ejemplo, los anticuerpos) hace a las inmunoterapias más efectivas y menos tóxicas. Es importante para la acción del agente de la inmunoterapia que el sistema inmunológico esté "preparado" para responder al máximo a su presencia. En la terapia combinada de la presente invención, el régimen de fondo es un régimen peptídico base que comprende un péptido que es un mimético de ligandos de azúcar, por ejemplo, los azúcares terminales de glicanos complejos. Los péptidos se adaptan de manera única a la inmunoterapia. Los péptidos son flexibles en su diseño, se sintetizan fácilmente a gran escala, son solubles en agua y relativamente estables, y se unen selectivamente a receptores con avidéz elevada. Su uso en la inmunoterapia se basa en su capacidad para imitar los azúcares y por tanto unirse a receptores reguladores de tipo lectina, por ejemplo, receptores de la superficie celular de lectina de tipo C, expresados por las células del sistema inmunológico [Geijtenbeek and Gringhuis, 2009; Garcia-Vallejo and van Kooyk, 2009]. Los péptidos se unen con una avidéz mucho más elevada que los ligandos de glicano y son adecuados para su desarrollo como medicamentos. De manera importante, un nivel significativo de toxicidad no acompaña a este enfoque de la inmunoterapia.

Preferentemente, los péptidos de la invención se unen a receptores reguladores de tipo lectina de particular beneficio para la amplificación de la respuesta inmunológica. En una realización, el péptido imita a la N-acetilgalactosamina (GalNAc), que se encuentra en el CD45, por ejemplo, el péptido es svL4 (VQATQSNQHTPR; SEQ ID NO:1) (véanse ejemplos 1-7). La actividad de la fosfatasa de CD45, una proteína de la superficie celular ampliamente expresada y abundante, se requiere para la activación y el desarrollo de los linfocitos [Trowbridge y Thomas, 1994]. CD45 elimina un fosfato inhibitorio de las quinasas de transducción de señales de la familia Src [Roskoski, 2005; McNeil et al., 2007], que en la activación de las células T se expresa como un aumento de la secreción de TNF α [van Vliet et al., 2006]. Las células humanas presentadoras de antígenos tales como los macrófagos y las células DC inmaduras expresan el receptor CLEC10a (CD301), que es específico para el GalNAc [van Vliet et al., 2008]. Tener como diana a CLEC10a, una diana estratégica para la activación de las células inmunitarias, una diana estratégica para la activación de las células inmunitarias, la presentación de antígenos a las células T CD4 y la diferenciación de las células T CD4⁺ productoras de IFN γ [Streng-Ouwehand et al. 2011]. La unión de los ligandos a CLEC10a provoca una mejora en las respuestas de linfocitos T CD8⁺ que producen IFN γ específicas de antígeno y desequilibra las células T CD4⁺ vírgenes hacia células Th1, con una mayor proliferación de células T. Además, Las DC median la activación y la proliferación de las células NK [Degli-Esposti and Smyth, 2005]. La unión *trans* de CLEC10a en una DC a un resto de GalNAc en CD45 en células T provoca una inhibición de células T [van Vliet et al., 2006]. La introducción de un factor que contiene GalNAc libera CD45 y permite la desfosforilación (inactivación) de receptores inhibitorios, la eliminación de los grupos fosfato inhibidores de quinasas de transducción de señales y la activación de células T. Los receptores inhibitorios que pueden inactivarse por la señal de CD45 incluyen CTLA-4 y PD-1.

Anticuerpos de la terapia combinada

Además del régimen peptídico base, la terapia combinada de la invención comprende un agente de inmunoterapia, por ejemplo, un anticuerpo. En realizaciones preferidas de la terapia combinada de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal contra una proteína de punto de control inmunológico. El bloqueo del punto de control inmunológico es una nueva y prometedora estrategia para inducir la regresión tumoral, estabilizar la enfermedad y prolongar la supervivencia mediante la manipulación del sistema inmunológico [Weber, 2010]. Las proteínas de punto de control inmunológico puede que se expresen por parte de la célula T o por la célula presentadora de antígeno. Las proteínas del punto de control inmunológico de las células T pueden ser, por ejemplo, CTLA-4 y PD-1. Puede ser una proteína de punto de control inmunológico de una célula presentadora de antígeno, por ejemplo, PD-L1 y PD-L2.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo contra CTLA-4 (α -CTLA-4). El uso del anticuerpo monoclonal completamente humano contra CTLA-4, ipilimumab o Yervoy (Bristol Myers Squibb), se ha convertido en un enfoque inmunoterapéutico primario para el tratamiento del cáncer. Los estudios en el ratón han demostrado que entre las células T en el interior de un tumor hay un elevado porcentaje de células Treg, que tienen una expresión elevada de CTLA-4 y, por tanto, anulan la respuesta inmunológica frente a las células tumorales. La introducción de α -CTLA-4 etiqueta a las células Treg y las marca para la destrucción mediada por anticuerpos por parte de los macrófagos. De modo que α -CTLA-4 reduce la población de células Treg.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo contra PD-1 (α -PD-1), que inhibe la interacción de PD-1 con sus ligandos para evitar la inhibición de las células T. PD-1 es un miembro de la extensa familia de reguladores de células T CD28/CTLA-4 [Ishida et al., 1992]. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales dirigidos a PD-1 que potencian el sistema inmunológico para el tratamiento del cáncer [Weber, 2010]. La FDA ha concedido la aprobación acelerada a Keytruda (pembrolizumab; MK-3475), El medicamento anti-PD-1 de Merck para el melanoma avanzado o que no se puede extirpar que ya no responde a otros medicamentos. El melanoma es un cáncer de piel que se origina en las células productoras de pigmento llamadas melanocitos. La enfermedad es particularmente rápida y mortal en los casos en los que metastatiza a otras zonas del cuerpo, particularmente el cerebro. Aproximadamente a 76000 personas se les diagnosticará melanoma en los EE.UU. este año y casi 10000 morirán. Keytruda se diseñó para usarse después del ipilimumab (Yervoy; Bristol-Myers Squibb), pero actualmente se usa clínicamente en combinación con Yervoy, que bloquea otro receptor de células T llamado CTLA-4 (véase más arriba). Bristol-Myers Squibb recibió la aprobación en Japón para su medicamento α -PD-1, Opdivo (nivolumab), lo que lleva a especular que podría ser el primero aprobarse en los EE. UU. Se han realizado estudios exhaustivos para mostrar una remisión tumoral duradera con nivolumab [Topalian et al., 2014].

El anticuerpo puede ser un anticuerpo contra los ligandos de PD-1. PD-L1 y PD-L2, dos ligandos de PD-1, son miembros de la familia B7 [Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001]. Muchas células tumorales expresan PD-L1, un ligando inmunosupresor de PD-1; la inhibición de la interacción entre PD-1 y PD-L1 puede mejorar las respuestas de las células T *in vitro* y mediar en la actividad antitumoral preclínica. PD-L1 se expresa en casi todas las líneas celulares de tumores murinos, incluyendo el mieloma PA1, mastocitoma P815 y melanoma B16 al tratarse con IFN γ . La expresión de PD-L2 es más restringida y se expresa principalmente en las DC y unas pocas líneas tumorales. La proteína PD-L1 se regula positivamente en los macrófagos y las células dendríticas (CD) en respuesta al tratamiento con lipopolisacáridos (LPS) y GM-CSF y en las células T y B tras la señalización de los receptores de células B y TCR [Iwai et al., 2002]. Esta respuesta a los LPS describe la razón fundamental para asegurar la eliminación de la endotoxina de los agentes terapéuticos contra el cáncer (véase la figura 4).

Ciertos estudios clínicos han demostrado que las combinaciones de ipilimumab y nivolumab tienen una mayor eficacia que cada una de ellas por separado [Curan et al, 2010; Wolchok et al., 2013]. Por tanto, mientras que el anticuerpo de algunas implementaciones de la invención ataca una ruta de punto control inmunológico, el anticuerpo de otras implementaciones de la invención puede atacar más que una ruta de punto de control inmunológico. Por ejemplo, la terapia combinada puede comprender un péptido con anticuerpos contra la ruta del CTLA-4 y la ruta del PD-1, que son dos rutas de punto de control inmunológico distintas.

50 Kits o composiciones farmacéuticas de la terapia combinada

Debido a que la terapia combinada comprende péptidos que tienen como objetivo receptores reguladores de tipo lectina y anticuerpos que afectan directamente a las células inmunitarias, la terapia combinada de la presente invención tiene como objetivo una combinación de vías de modulación inmunológica. Por ejemplo, mientras que los anticuerpos actúan uniéndose a las proteínas de punto de control en la superficie celular, la estimulación de la actividad de la fosfatasa por CD45 y otras fosfatasas causa la desfosforilación de CTLA-4 y PD-1 y de la proteína accesoria SHP-1 a través de la cual estas proteínas actúan, por tanto, la terapia combinada que comprende los péptidos de la invención y los anticuerpos también puede inactivar los receptores inhibidores desde el interior de la célula. Sin embargo, la terapia combinada de la presente invención puede dirigirse a combinaciones mayores de vías de modulación inmunológica con el uso de múltiples péptidos y/o múltiples anticuerpos. Por tanto, la terapia combinada comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un péptido y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo. En algunas realizaciones, el péptido de la terapia combinada tiene una secuencia peptídica activa representada por la SEQ ID NO: 1 (VQATQSNQHTPR). El péptido puede ser tetravalente. Las secuencias peptídicas activas del péptido tetravalente pueden estar conectadas al núcleo por una secuencia enlazadora. En algunas realizaciones, el núcleo es un núcleo de tri-lisina y la secuencia enlazadora es -GGGS- (SEQ ID NO:2). Un péptido tetravalente ejemplar tiene la estructura [(VQATQSNQHTPRGGGS)2K]2K-NH2

(SEQ ID NO:3).

5 En el kit o la composición, los péptidos pueden ser diferentes miméticos que se dirigen al mismo receptor regulador de tipo lectina. Por ejemplo, en el caso de un kit o composición que comprende dos péptidos, ambos péptidos pueden dirigirse a CLEC10a pero cada uno puede ser un mimético de GalNAc o de Gal. Como alternativa, los péptidos pueden ser diferentes miméticos que se dirigen a diferentes receptores reguladores de tipo lectina.

10 En algunas realizaciones del kit o composición, los anticuerpos se dirigen a diferentes rutas de punto de control inmunológico, por ejemplo, los anticuerpos se dirigen a la ruta del punto de control de CTLA-4 o a la ruta del punto de control de PD-1. Por tanto, los anticuerpos de la terapia combinada pueden comprender α -CTLA-4 y uno de α -PD-1 o α -PD-L1.

15 También están dentro del alcance de la presente invención derivados y sales farmacéuticamente aceptables del péptido y de los anticuerpos, y su uso para los métodos descritos en el presente documento. Tales sales pueden prepararse usando el conocimiento en las técnicas farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse en formas de dosificación individuales. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación de la invención comprenden los principios activos desvelados en el presente documento. La notación de "el agente farmacéutico" significa los compuestos de la invención descritos en el presente documento o sales de los mismos. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación de la invención pueden comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 La expresión "farmacéuticamente aceptable" puede significar aprobado por un organismo regulador del gobierno federal o estatal o incluido en la Farmacopea de los Estados Unidos o en otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más concretamente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra un principio activo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluyendo los que proceden del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Los vehículos farmacéuticos pueden ser solución salina, goma arábiga, gelatina, pasta de almidón, talco, queratina, sílice coloidal, urea y similares. Además, se pueden usar otros excipientes.

30 La composición, la forma y el tipo de dosificación de la invención variarán típicamente dependiendo de su vía de administración y del sujeto que se esté tratando. Por ejemplo, una forma de dosificación parenteral puede contener cantidades más pequeñas de uno o más de los principios activos que comprende que una forma de dosificación oral usada para tratar la misma enfermedad. Estas y otras formas en las que las formas de dosificación específicas incluidas por esta invención variarán entre sí serán evidentes para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing, Easton Pa. (1990).

40 Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación típicas comprenden uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica de la farmacia, y en el presente documento se proporcionan ejemplos no limitantes de excipientes adecuados. Si un excipiente particular es adecuado para la incorporación en una composición farmacéutica o forma de dosificación depende de una variedad de factores ampliamente conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, la manera en que la forma de dosificación se administrará a un paciente. Por ejemplo, Las formas de dosificación oral, tales como comprimidos, pueden contener excipientes que no son adecuados para su uso en formas de dosificación parenteral. La idoneidad de un determinado excipiente también puede depender de los principios activos específicos de la forma de dosificación. Por ejemplo, la descomposición de algunos principios activos puede acelerarse por algunos excipientes tales como la lactosa, o cuando se exponen al agua.

50 La invención abarca además composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más compuestos que reducen la velocidad con la que se descompone un principio activo. Dichos compuestos, a los que se hace referencia en el presente documento como "estabilizantes", incluyen, pero sin limitación, antioxidantes tales como ácido ascórbico, tampones de pH o tampones salinos.

55 Para una afección o método de tratamiento concreto, la dosis se determina empíricamente, usando métodos conocidos, y dependerá de hechos tales como la actividad biológica del compuesto concreto empleado, los medios de administración, la edad, la salud y el peso corporal del hospedador; la naturaleza y el alcance de los síntomas; la frecuencia del tratamiento; la administración de otras terapias y el efecto deseado. A continuación se describen varias dosis y métodos de administración posibles, con el entendimiento de que lo que viene a continuación tiene carácter meramente ilustrativo. Las dosis y el método de administración o liberación reales pueden determinarse por un experto en la materia. La frecuencia de dosificación también puede variar dependiendo del compuesto que se usa y de si se usa una formulación de liberación prolongada.

65 Las composiciones farmacéuticas de la invención que son adecuadas para la administración oral pueden presentarse como formas de dosificación diferenciadas, tales como, pero sin limitación, comprimidos (por ejemplo, comprimidos masticables), comprimidos oblongos, cápsulas y líquidos (por ejemplo, jarabes aromatizados). Tales formas de dosificación contienen cantidades predeterminadas de principios activos y pueden prepararse por

métodos farmacéuticos ampliamente conocidos por los expertos en la materia. Véase, en general, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing, Easton Pa. (1990).

5 Las formas de dosificación orales típicas de la invención se preparan combinando los principios activos en una profunda mezcla con al menos un excipiente de acuerdo con las técnicas convencionales de composición farmacéutica. Los excipientes pueden tomar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para su uso en formas de dosificación líquidas orales o en aerosol incluyen, pero sin limitación, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, y agentes colorantes. Los ejemplos de excipientes adecuados para su uso en formas de dosificación oral sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos, cápsulas y comprimidos) incluyen, pero sin limitación, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes.

15 Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas de dosificación oral unitarias más ventajosas, en cuyo caso se emplean excipientes sólidos. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas habituales acuosas o no acuosas. Tales formas de dosificación pueden prepararse por cualquiera de los métodos de la farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación se preparan mezclando uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego dando forma al producto en la presentación deseada si es necesario.

20 Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo. Los comprimidos obtenidos por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada los principios activos en una forma fluida tal como polvo o gránulos, mezclada opcionalmente con un excipiente. Los comprimidos obtenidos por moldeo pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

30 Los ejemplos de excipientes que pueden usarse en formas de dosificación oral de la invención incluyen, pero sin limitación, aglutinantes, cargas, disgregantes y lubricantes. Los aglutinantes adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación incluyen, pero sin limitación, almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, alginato de sodio, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, almidón pre-gelatinizado, hidroxipropilmetilcelulosa, (por ejemplo, N.º 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina y mezclas de los mismos.

35 Las formas adecuadas de celulosa microcristalina incluyen, pero sin limitación, los materiales comercializados como AVICEL-PH-101, AVICEL-PH-103 AVICEL RC-581, AVICEL-PH-105 (disponible en FMC Corporation, American Viscose Division, Avicel Sales, Marcus Hook, Pa.), y mezclas de los mismos. Un aglutinante específico es una mezcla de celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica comercializada como AVICEL RC-581. Los excipientes o aditivos anhidros o de baja humedad incluyen AVICEL-PH-103 y Starch 1500 LM.

45 Los ejemplos de cargas adecuadas para su uso en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, talco, carbonato de calcio (por ejemplo, en gránulos o en polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado y mezclas de los mismos. El aglutinante o carga en las composiciones farmacéuticas de la invención está presente típicamente en una proporción de aproximadamente un 50 a aproximadamente un 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica o forma de dosificación.

50 Los disgregantes se usan en las composiciones de la invención para proporcionar comprimidos que se disgregan cuando se exponen a un ambiente acuoso. Los comprimidos que contienen demasiado disgregante pueden disgregarse durante el almacenamiento, mientras que los que contienen demasiado poco pueden no disgregarse a una velocidad deseada o en las condiciones deseadas. Por tanto, para formar formas sólidas de dosificación oral de la invención debe usarse una cantidad suficiente de disgregante que no sea ni demasiado ni demasiado poco para alterar perjudicialmente la liberación de los principios activos. La cantidad de disgregante que se usa varía según el tipo de formulación y es fácilmente discernible por los expertos en la materia. Las composiciones farmacéuticas habituales comprenden desde aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 15 por ciento en peso de disgregante, preferentemente desde aproximadamente un 1 a un 5 por ciento en peso de disgregante.

60 Los disgregantes que pueden usarse en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de la invención incluyen, pero sin limitación, agar-agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina de potasio, glicolato sódico de almidón, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas y mezclas de los mismos.

65 Los lubricantes que pueden usarse en composiciones farmacéuticas y formas de dosificación de la invención incluyen, pero sin limitación, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero,

glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato sódico, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de cinc, oleato de etilo, laureato de etilo, agar y mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice syloid (AEROSIL 200, fabricado por W.R. Grace Co. de Baltimore, Md.), un aerosol de sílice sintética coagulado (comercializado por Degussa Co. de Plano, Tex.), CAB-O-SIL (un producto de dióxido de silicio pirogénico comercializado por Cabot Co. de Boston, Masa.) y mezclas de los mismos. Si es que se usan, los lubricantes se usan típicamente en una cantidad inferior a aproximadamente el 1 por ciento del peso de las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación en las que se incorporan.

Una forma de dosificación oral sólida preferida de la invención comprende un principio activo, lactosa anhidra, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, ácido esteárico, sílice anhidra coloidal y gelatina.

Métodos de administración

Se proporciona un método para administrar la terapia combinada de la invención en el que el péptido y el anticuerpo se administran por separado o en una formulación en la que los medicamentos combinados pueden administrarse como una sola aplicación. Por ejemplo, como en el ejemplo 8, se proporciona la administración de svL4 y el anticuerpo monoclonal α -CTLA-4 en una sola aplicación.

La administración de la terapia combinada puede comprender el inicio de la administración del péptido al mismo tiempo que el anticuerpo. La terapia combinada para activar la respuesta inmunológica adaptativa puede administrarse administrando primero el péptido para sensibilizar el sistema inmunológico antes de administrar el anticuerpo. Por ejemplo, el péptido puede administrarse por lo menos dos semanas, al menos diez días, al menos una semana, al menos cinco días, al menos tres días, o al menos un día antes de la administración del anticuerpo. La administración del péptido puede continuar incluso después de la administración del anticuerpo. Por tanto, la administración del péptido también puede ser simultánea con respecto al curso de la administración del anticuerpo. Por ejemplo, el ipilimumab se suele inyectar por vía intravenosa cada 3 semanas, por lo que durante el tratamiento con ipilimumab, también puede administrarse el péptido.

En algunas implementaciones, la administración del péptido puede continuar después del período de tratamiento con anticuerpos. Un beneficio de este método es el mantenimiento del efecto beneficioso del tratamiento con anticuerpos incluso sin un tratamiento posterior con el anticuerpo.

El método de administración, así como la frecuencia y la dosis se establecen en la técnica anterior para el anticuerpo que ya está aprobado por la FDA. Por ejemplo, el ipilimumab suele inyectarse por vía intravenosa durante un período de 90 minutos, y cada dosis unitaria se administra cada tres semanas con un solo ciclo de hasta cuatro dosis. Sin embargo, la administración simultánea del péptido y el anticuerpo puede ser con una frecuencia de cada semana.

La dosis unitaria del péptido puede administrarse en días alternos o semanalmente. Las formas de dosificación unitaria del péptido de la divulgación son adecuadas para la administración oral, mucosa (por ejemplo, nasal, sublingual, vaginal, bucal o rectal), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, inyección en embolada, intramuscular o intraarterial) o transdérmica a un paciente. Los ejemplos de formas de dosificación incluyen, pero sin limitación: comprimidos; comprimidos oblongos; cápsulas, tales como cápsulas de gelatina blanda elástica; obleas; trociscos; grageas; dispersiones; supositorios; pomadas; cataplasmas (emplastos); pastas; polvos; apósitos; cremas; escayolas; soluciones; parches; aerosoles (por ejemplo, aerosoles nasales o inhaladores); geles; formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración oral o mucosa a un paciente, incluyendo suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas), emulsiones de aceite en agua, o una emulsión líquida de agua en aceite), soluciones y elixires; formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente; y sólidos estériles (por ejemplo, sólidos cristalinos o amorfos) que pueden reconstituirse para proporcionar formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente. El péptido se administra preferentemente por vía parenteral, aún más preferentemente, por vía subcutánea. El péptido también puede administrarse por vía intravenosa. El péptido puede administrarse solo o en una composición con el anticuerpo.

El péptido puede administrarse cantidades de dosificación unitaria de aproximadamente 0,1 nmol/kg de peso corporal a aproximadamente 1500 nmol/kg de peso corporal, que corresponde a aproximadamente 0,7 μ g/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. La dosificación unitaria del péptido también puede ser de aproximadamente 100 nmol/kg de peso corporal a aproximadamente 1500 nmol/kg de peso corporal, de aproximadamente 100 nmol/kg de peso corporal a aproximadamente 1000 nmol/kg de peso corporal, de 3 nmol/kg de peso corporal a aproximadamente 1500 nmol/kg de peso corporal, de 3 nmol/kg de peso corporal a aproximadamente 1000 nmol/kg de peso corporal, de 3 nmol/kg de peso corporal a aproximadamente 10 nmol/kg de peso corporal, aproximadamente de 1 nmol/kg de peso corporal a aproximadamente 1000 nmol/kg de peso corporal, o aproximadamente de 0,1 nmol/kg de peso corporal a aproximadamente 1 nmol/kg de peso corporal.

El péptido puede administrarse en una cantidad de dosificación unitaria de menos de aproximadamente 1500 nmol/kg de peso corporal, por ejemplo, de aproximadamente 1000 nmol/kg de peso corporal, aproximadamente 500 nmol/kg, aproximadamente 100 nmol/kg, aproximadamente 10 nmol/kg, aproximadamente 1 nmol/kg o aproximadamente 0,1 nmol/kg. El péptido puede administrarse en cantidades de dosificación unitarias de

- 5 aproximadamente 5 nmol, aproximadamente 10 nmol, aproximadamente 15 nmol, aproximadamente 25 nmol, aproximadamente 30 nmol, aproximadamente 50 nmol, aproximadamente 75 nmol, aproximadamente 100 nmol, aproximadamente 225 nmol, aproximadamente 250 nmol, aproximadamente 500 nmol, aproximadamente 750 nmol, aproximadamente 1 μ mol, aproximadamente 10 μ mol o aproximadamente 50 μ mol.
- 10 Pueden administrarse formas de dosificación parenteral a los pacientes por diversas vías, que incluyen, pero no se limitan a, subcutánea, intravenosa, inyección en embolada, intramuscular e intraarterial. Preferentemente, la forma de dosificación parenteral es adecuada para la administración subcutánea. Las formas de dosificación parenteral de la invención son preferentemente estériles o capaces de esterilizarse antes de la administración a un paciente. Los
- 15 ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen, pero sin limitación, soluciones listas para inyección, productos secos listos para disolverse o suspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas para inyección, y emulsiones.

Los vehículos adecuados que se pueden usar para proporcionar formas de dosificación parenterales de la invención son ampliamente conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación: agua para inyección USP; vehículos acuosos, tales como, pero sin limitación, solución salina tamponada con fosfato, inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, e inyección de Ringer lactato; vehículos miscibles en agua tales como, pero sin limitación, alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos tales como, pero sin limitación, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

25

Ejemplos

La presente invención está además ilustrada por los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como limitantes..

30

1. svL4, un péptido ejemplar de la invención

Se encontró péptido mimético de GalNAc, designado svL4, en una exploración de una biblioteca de fagos con la lectina específica de GalNAc de *Helix pomatia* [Eggink y Hooper, 2009, 2010]. La forma tetravalente del péptido tiene la estructura [(VQATQSNQHTRGGGS)₂K]₂K-NH₂ (SEQ ID NO:3, figura 1). El péptido se sintetizó por química estándar de fase sólida y se preparó libre de endotoxinas con una pureza >95 % por procedimientos cromatográficos (figuras 2-4).

35

2. La actividad de unión de svL4 a receptores humanos de tipo lectina

40

Se determinaron las actividades de unión de svL4 para el CLEC10a recombinante humano, ASGPR1, y langerina. La figura 5 presenta las actividades de unión del svL4 a varias lectinas reguladoras. De las lectinas ensayadas, svL4 se une fuertemente a CLEC10a, Langerina, ASGPR-1 y Dectina-1.

45

3. Efecto del grupo de péptidos svL4 en la maduración de las células inmunitarias en ratones de tipo salvaje

Para examinar la maduración de células inmunitarias peritoneales, se administraron a ratones (cepa C57BL/6, machos, de 6-8 semanas de edad) inyecciones subcutáneas de 1 nmol/g de svL4 tetravalente los días 0, 2, 4 y 6. La expresión de biomarcadores con células teñidas con anticuerpos contra los marcadores se muestra en la figura 6. Se produjeron cambios drásticos en las células obtenidas de la cavidad peritoneal de estos animales, un sitio destacado de función inmunológica. Después de dos tratamientos como se ilustra en la figura 6, se encontró maduración de células inmunitarias en varias poblaciones de células, las cuales mostraron un aumento de células altamente teñidas en los ratones tratados con C57BL/6 el día 3. Por tanto, la administración subcutánea de svL4 mejora la maduración de las células inmunitarias en la cavidad peritoneal.

50

55

Se encontraron incrementos en poblaciones teñidas con anticuerpos contra CD11c (células dendríticas), que están reguladas positivamente en la mayoría de las células presentadoras de antígenos activadas (células dendríticas, macrófagos y células B). La población de macrófagos (F4/80+CD11b+) aumentó drásticamente durante los 3 días iniciales del tratamiento. También se elevó el número de células dendríticas (CD11c⁺) y de células dendríticas activadas. Las células CD8⁺ se elevaron ligeramente, y las NK CD49b+CD69⁺ (activas) se elevaron en gran medida. En la figura 6 se muestran los cambios en el día 3 con inyecciones en días alternos.

60

En un segundo experimento, se examinó el transcurso en el tiempo de los cambios en las poblaciones de células adicionales, que incluyen macrófagos (F4/80 CD11b), macrófagos activados (F4/80 CD11b CD86, DC (CD11c), células NKT (NK1.1 CD3⁺), células NKT activadas (NK1.1 CD3⁺ CD69), células NK activadas (NK1.1 CD3⁻ CD69), células Th activadas (CD4 CD69) células T citotóxicas (CD8 CD69), células B (CD19), y de células B de memoria

65

(CD19 CD73 CD80 CD273). Las respuestas, representadas por el número de cada tipo celular durante 5 días con inyecciones en días alternos, están representadas en la figura 7.

4. Efecto de svL4 en el suero de ratones portadores de tumores de cáncer de mama

Para determinar si las respuestas en las proteínas séricas en ratones portadores de tumores serían diferentes de las de ratones sanos, se recogieron sueros de ratones hembra en los que se habían implantado células 4T1 de cáncer de mama. Después de que los tumores crecieran durante un período de 10 a 12 días hasta un tamaño de ~500 mm³, se inyectó svL4 tetravalente por vía subcutánea en dosis de 0,1 y de 1,0 nmol/g. Cuatro horas después de la inyección se extrajo la sangre y se prepararon los sueros. Los sueros de los animales no tratados tenían bajos niveles de citocinas y quimiocinas a las 4 h. En la tabla 1 se enumeran factores que reflejan la activación de células inmunitarias típicas. Con unas pocas proteínas, tales como IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF α , los valores eran muy bajos en los animales no tratados y al tratarse con svL4 se incrementaron, pero aún así fueron casi indetectables en los puntos de la matriz. El tratamiento generalmente ocasionó aumentos en muchas de las proteínas, típicamente en el intervalo de 3 a 5 veces. Varias citocinas que aumentaron pero que aún estaban en baja cantidad incluían GM-CSF, CCL4, IGFBP-1, IL-21, linfotóxina- α e IL-17. Las proteínas principales incluían CCL1, CCL8, CCL28, Endostatina, Fas, HVEM, IL-11, IL-12p70, IL-16, IL-27, IL-28, MIP-2, MMP-9, NOV, Soggy-1, SPARC, TIMP-2, TLR2 y VEGF-B. En algunos casos, la dosis más elevada provocó una mayor cantidad de la proteína, mientras que con varias proteínas la cantidad era menor con la dosis más elevada. Con la mayoría de las citocinas, la magnitud de los cambios sugirió respuestas dependientes de la dosis en este intervalo. Se identificaron varias proteínas solubles como receptores de la superficie celular, tales como Fas, HVEM y TLR2, que indicaba una importante pérdida por parte de células activadas. La HVEM soluble era una proteína importante en los ratones portadores de tumores, así como en los ratones sanos, pero el nivel en los ratones de control fue mayor en los ratones con cáncer de mama, lo que llevó a que solo se incrementara dos veces después del tratamiento con svL4.

Tabla 1. Marcadores de activación de linfocitos y monocitos en respuesta a svL4 en ratones Balb/c portadores de tumores de mama en comparación con los ratones sanos. *En estas muestras, el valor de control fue insignificante, por tanto, el incremento en veces en las muestras tratadas cuando la cantidad fue detectable, incluso aunque fuera muy poco, parecía elevado.

Citocina	Incremento en veces en ratones tratados vs no tratados	Expresión	Balb/c sano
Máximo a 0,1 nmol/g de svL4			
IL-2	56	Células T	Elevado*
IL-15	Elevado*	Fagocitos mononucleares	Elevado*
IL-17	Elevado*	Células T colaboradoras	No hay cambio
IL-23	Elevado*	Células dendríticas y macrófagos	0,55
IL-27	4,5	Las células presentadoras de antígenos, promueven una respuesta Th1	Elevado*
IL-28	4,3	Aumentos en la liberación de IFN γ , potencial citotóxico de las células T CD8 ⁺	Elevado*
IL-31	3,5	Células T Th2 activadas	Elevado*
MIP-2/CXCL2	~ 6	Secretada por monocitos y macrófagos	No hay cambio
Pentraxin3	~ 4	Fagocitos mononucleares, células dendríticas y neutrófilos	0,21
SPARC	~ 5	Osteoblastos, macrófagos en la zona de reparación de una herida	No hay cambio
TIMP-2	2,9	Monocitos y placenta (supresores de metástasis)	0,45
TNF α	4,6	Monocitos activados y macrófagos	0,2
TLR2	4,2	Monocitos activados, células dendríticas, macrófagos y células B y T	0,37
Linfotóxina- α	12,5	Células T Th1	0,74
Máximo a 0,1 nmol/g y 1 nmol/g de svL4			
IL-16	4	Liberada por linfocitos	0,57
sHVEM	~ 2	Monocitos y linfocitos activados (los ratones sanos de control tenían niveles bajos)	5
Máximo a 1 nmol/g de svL4			
IFN γ	Elevado*	Linfocitos activados primariamente	No hay cambio

(continuación)

Citocina	Incremento en veces en ratones tratados vs no tratados	Expresión	Balb/c sano
CCL1	2,5	Células T activadas	No hay cambio
CCL8/MCP-2	5	Inducido por IFN γ	Elevado*
Máximo a 1 nmol/g de svL4			
IL12p70	3,5	Células dendríticas y macrófagos	No hay cambio
IL-21	Elevado*	Células CD4 $^+$ activadas	No hay cambio

Estas proteínas se expresan por una variedad de tipos celulares, que incluyen células T CD4 $^+$ y CD8 $^+$ activadas, células dendríticas y macrófagos, y están casi todas involucradas en la regulación del sistema inmunológico. El patrón de expresión de las citocinas/quimiocinas proporciona una fuerte respuesta inmunológica contra el cáncer. Es de particular importancia que, aunque un gran número de citocinas y quimiocinas aumentan en el suero en respuesta al tratamiento, no se produjo un patrón típico de una "tormenta de citocinas" tóxica.

Se observaron diferencias significativas entre las proteínas séricas de los ratones sanos y los ratones portadores de tumores. Mientras que en los ratones sanos disminuyeron, IL-16, MMP-9, P-selectina, Soggy-1, TLR2, TRAIL y TIMP-2, estos factores aumentaron drásticamente en los ratones portadores de tumores en respuesta al svL4. IL-1 α , IL-6, IFN γ , TNF α y TGF β , que estaban presentes en niveles muy bajos y no aumentaron en los ratones sanos, eran detectables en ratones portadores de tumores y aumentaron significativamente en respuesta al svL4. En la tabla 1 se muestran comparaciones adicionales. La columna del extremo derecho de la tabla 1 muestra la proporción de muestras tratadas (1 nmol/g) vs. no tratadas obtenidas en un experimento separado con ratones Balb/c sanos. Varias proteínas, en concreto IL-15, IL-17, IL-21, IL-28, IL-31 y CCL8/MCP-2 tuvieron valores insignificantes en los ratones no tratados, y por tanto el valor tratado tuvo una elevada proporción. Curiosamente, las citocinas que estaban fuertemente elevadas en los ratones con tumores se redujeron a menudo en los ratones sanos en respuesta al svL4 o no mostraron ningún cambio.

5. Tratamiento de melanoma con svL4 y α -CTLA-4

Las investigaciones han demostrado que α -CTLA-4 es ineficaz contra el melanoma en el ratón a menos que se añada una fuente de GM-CSF, que rutinariamente se proporcionaba por inyección de células GVAX modificadas por ingeniería genética e irradiadas [Quezada et al., 2006]. Mientras que el receptor inhibitorio, CTLA-4, se expresaba en niveles elevados por las células Treg dentro de los tumores, la destrucción de células con α -CTLA-4 unido requería de macrófagos que expresaran FcyRIV [Simpson et al., 2013]. Debido a que la administración de svL4 causa proliferación y maduración de monocitos, se probó si svL4 podía reemplazar a GM-CSF. Para este experimento, se implantaron en el costado derecho de ratones machos C57BL/6 1,5 x 10 5 células tumorales B16. Las inyecciones subcutáneas de 1 nmol/g de svL4 tetravalente se iniciaron el día 0 y se les proporcionó Q2D durante todo el experimento. Las inyecciones intraperitoneales de 100 μ g de anticuerpo monoclonal α -CTLA-4 (clon 9H10 de BioXCell) se administraron Q3D a partir del día 3. El tratamiento combinado mantuvo estas frecuencias de inyección.

El crecimiento tumoral se midió en días alternos. Los aumentos más rápidos del volumen tumoral ocurrieron dentro del grupo tratado solo con α -CTLA-4, mientras que los aumentos más lentos se produjeron en el grupo tratado con α -CTLA-4 con 1 nmol/g de svL4 tetravalente (tabla 2).

Tabla 2. Volumen de tumores de melanoma el día 11. (*A los animales de este grupo se les realizó la eutanasia por heridas de peleas).

Grupo	Volumen medio (mm 3)	Desv. Típica	SEM	n
Control	455	613	204	4
svL4, 1 nmol/g	201	95	39	6*
α -CTLA-4	680	825	242	8
α -CTLA-4 + svL4	137	91	32	8

Cuando la mayoría de los tumores del grupo no tratado alcanzaron un volumen máximo de 1500 mm 3 , los ratones se sacrificaron y se extirparon los tumores primarios de dos animales representativos de cada grupo y se analizaron por citometría de flujo. Las células T efectoras (Teff) se definieron como CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^-$ CD39 $^-$ mientras que las células Treg se definieron como CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD25 $^+$ CD39 $^+$ [Dwyer et al., 2010]. Las células CD25 $^+$ /CD39 $^-$ y CD25 $^-$ /CD39 $^+$ no caracterizadas se excluyeron del cálculo de la Teff:Treg. En la figura 8 se muestra un resumen de los análisis de las células T. (En la figura 9 se muestran ejemplos de los gráficos de datos de la citometría de flujo). El porcentaje más bajo de células Treg entre la población total de células T se produjo en los tumores de animales tratados solo con 1 nmol/g de svL4 (figura 8A). Curiosamente, el porcentaje más elevado entre los grupos tratados se produjo en los animales tratados con α -CTLA-4. La adición de 1 nmol/g de svL4 al tratamiento con α -CTLA-4 redujo drásticamente el porcentaje de células Treg. De la misma manera, la proporción más elevada de células Teff:Treg entre los grupos tratados se encontró solo con 1 nmol/g de svL4 (figura 8B).

Los datos indican que 1 nmol/g de svL4 complementaba la actividad de α -CTLA-4 al reducir la población de células Treg. En efecto, svL4 disminuyó el número de células Treg por un mecanismo independiente de α -CTLA-4. Una posible explicación para la fuerte disminución de las células Treg, independiente de los anticuerpos, la proporcionan los datos de citocinas con suero de ratones Balb/c portadores de cáncer de mama (tabla 1). svL4 indujo un aumento varias veces mayor de IL-12p70, IL-21 e IL-27 en 4 h. Estas citocinas están implicadas en la supresión de la proliferación de células Treg y en la disminución de la expresión de los receptores de IL-2 [Zhao et al., 2012]. El svL4 no indujo un aumento de la IL-10, una citocina inhibitoria secretada por las células Treg. En estudios clínicos, la disminución de las células Treg parece más significativa para un resultado terapéutico positivo que la relación Teff:Treg [Sim et al., 2014]. Por tanto, la disminución de las células Treg en los grupos tratados con svL4, junto con la maduración de los macrófagos, células dendríticas, células T citotóxicas CD8⁺ y linfocitos citolíticos naturales que observamos en respuesta a la administración de svL4 (figura 6), apoyarían una poderosa mejora del ataque del sistema inmunológico contra el cáncer.

Los datos muestran que el svL4 solo y en combinación con α -CTLA-4 tiene papeles fundamentales en la reducción de las células T reguladoras inmunosupresoras en los tumores. Los datos sugieren que los dos factores tienen actividades separadas pero complementarias. Por tanto, se plantea la hipótesis de que ese tratamiento debería ser apropiado para una variedad de cánceres. De hecho, α -CTLA-4 se está probando actualmente en ensayos de fase II y III en melanoma, y en ensayos de fase I/II en otros tipos de tumores. Se han observado pruebas de regresión tumoral y respuestas duraderas con el ipilimumab monoclonal en pacientes con cáncer de ovario, cáncer de próstata y cáncer de células renales [Weber, 2010]. Los anticuerpos contra CTLA-4 son más eficaces contra los cánceres en los humanos que en el ratón. svL4 es eficaz en el ratón y también se espera que sea eficaz en los humanos. Los anticuerpos contra CTLA-4 (ipilimumab) son eficaces solo en un 20 a un 30% de los pacientes, y la eficacia se duplica aproximadamente cuando se combina con nivolumab, un anticuerpo contra otro marcador de punto de control PD-1 [Wolchok et al., 2013]. Estas combinaciones han aumentado su eficacia porque se dirigen a diferentes receptores inhibitorios. Por tanto, en base a los datos del estudio del melanoma en ratones, la adición de svL4 a un tratamiento con α -CTLA-4, α -PD-1 o α -PD-L1 debería aumentar el efecto beneficioso. La invención satisface la necesidad expresada por los oncólogos de una terapia de base o de fondo no tóxica que active una serie de células y "sensibilice" al sistema inmunológico. Estos anticuerpos de bloqueo de puntos de control pueden proporcionar entonces terapias enfocadas a dosis más bajas y con menos toxicidad.

El tratamiento del cáncer suele comenzar después del diagnóstico, que a menudo se encuentra en el punto de enfermedad avanzada. Para proporcionar una activación inicial del sistema inmunológico, el svL4 se administra en días alternos mediante una inyección subcutánea. La activación de las células inmunitarias se detecta en el ratón después de la segunda o tercera inyección, es decir, el día 3 o 5 después del comienzo del tratamiento. El ipilimumab suele inyectarse por vía intravenosa cada 3 semanas. La administración continuada en días alternos de svL4 mantendría el sistema inmunológico en un estado elevado de activación y, por tanto, establecería las condiciones para que el sistema inmunológico logre el máximo beneficio de las inyecciones de α -CTLA-4. Debería ser factible un método similar con α -PD-1.

6. Tratamiento de glioblastoma con svL4

Se encontró una infiltración masiva de células T reguladoras (Treg) en el glioblastoma y en los tumores cerebrales metastásicos, que suprimió eficientemente la secreción de citocinas y la proliferación de linfocitos efectoras [Joannes et al., 2009]. La mayoría de las células malignas expresaron PD-L1 mientras que PD-1 se expresó en un subconjunto de células T efectoras. Para probar si svL4 mostraría eficacia contra los tumores cerebrales, se implantaron células de glioma (línea celular murina GL261) en un hemisferio del cerebro de ratones (cepa C57BL/6, hembras, 6-8 semanas de edad). Después de un período de una semana para permitir el desarrollo de un tumor, el svL4 tetravalente se inyectó por vía subcutánea a una dosis de 1 nmol/g en días alternos durante dos semanas [Kushchayev et al., 2012a, 2012b].

La supervivencia de los ratones (cepa C57BL/6, hembra, 6-8 semanas de edad) con células de glioma implantadas (línea celular murina GL261) se determinó después del tratamiento solamente con radiación (4 Gy el día 7 y 9), péptido (1 nmol/g) solo en días alternos a partir del día 7, o radiación más péptido. Como se muestra en la figura 10A, el tamaño tumoral se redujo ligeramente en los animales tratados con péptidos, pero la vida de los animales no se prolongó significativamente (tabla 3). Sin embargo, junto con la radiación, el péptido prolongó drásticamente la vida, con un incremento del doble desde el comienzo del tratamiento (figura 10B). Estos resultados sugieren que las células fagocíticas activadas en el cerebro no pueden atacar eficazmente un tumor sólido, aunque el tumor parecía expandirse inicialmente por la invasión de células fagocíticas. Después de la radiación, las células tumorales aparentemente fueron dañadas lo suficiente como para permitir su destrucción por los fagocitos, que se indicó por la marcada reducción del tamaño tumoral. El tamaño tumoral mínimo en el día 19 con la terapia combinada sugiere que el crecimiento tumoral se ralentizó, un indicador significativo del potencial clínico [Teicher, 2006].

Tabla 3. Supervivencia media de los ratones en el experimento mostrado en la figura 11

Tratamiento	Supervivencia después de la implantación (días)
Control (inyección salina falsa)	21
svL4 (1 nmol/g, administrado en días alternos)	22
Radiación (2 tratamientos de 4 Gy cada uno)	30
svL4 + Radiación	38

7. Estudio de respuesta a la dosis de svL4

5 En la mayoría de nuestros experimentos con ratones, el svL4 tetravalente se administró rutinariamente en una dosis de 1 nmol/g en días alternos, que consideramos que es la dosis máxima efectiva pero no necesariamente la óptima. En otros experimentos encontramos una mayor eficacia a dosis de 0,1 a 0,2 nmol/g (0,68 a 1,4 mg/kg). En un experimento con ratones en los que se implantaron células de glioma en el cerebro, una sola dosis de 0,1 nmol/g en días alternos fue más efectiva para causar la reducción del tamaño de los tumores de glioblastoma que dosis más elevadas (figura 11).

10 La radiación ionizante tiene un efecto sinérgico con el péptido en el sistema inmunológico, como se muestra en la figura 10. De hecho, se ha comprobado que el éxito en el tratamiento del cáncer depende en gran medida de la sinergia de la radioterapia con la respuesta inmunológica del hospedador. Sin embargo, una dosis elevada de radiación, definida como mayor de 1 Gy, es inmunosupresora. No obstante, la radiación regula positivamente las proteínas de estrés en las células cancerosas, lo que mejora la capacidad de las células presentadoras de antígenos para iniciar una respuesta antitumoral para eliminar las células dañadas por fagocitosis o actividad citolítica [revisado en Manda et al., 2012].

20 Se realizó un experimento similar en el que el agente terapéutico fue el anticuerpo α -PD-1. Al igual que con svL4, se demostró la mejora de la supervivencia con la combinación de la terapia α -PD-1 más la radiación. La supervivencia media fue de 25 días para los ratones de control, 27 días en el grupo de solo α -PD-1, 28 días en el brazo de radiación, y 53 días en el grupo de radiación más α -PD-1 [Zeng et al., 2013]. Viendo estos experimentos juntos, una terapia combinada de svL4 con α -PD-1 más radiación debería proporcionar una supervivencia a largo plazo.

30 Por lo tanto, la inmunoterapia puede optimizarse mediante la administración de dosis apropiadas de svL4 combinadas con otras terapias tales como α -PD-1, α -PD-L1 y radiación de baja dosis. Se espera que el tratamiento con esta combinación sea sinérgico y muestre una mejora drástica en la supervivencia de los pacientes que se someten inicialmente a la citorreducción quirúrgica del tumor de glioblastoma.

8. Tratamiento del cáncer de ovario con svL4

35 Se obtuvieron más pruebas de concentraciones óptimas de svL4 cercanas a 0,1 nmol/g en un experimento con un modelo de cáncer de ovario de ratón (Roby et al., 2000). Se implantó una línea celular de cáncer de ovario en la cavidad peritoneal de ratones hembra C57BL/6, y el tratamiento con svL4 tetravalente comenzó 45 días después, para imitar una etapa tardía en la que la se diagnóstica a la mayoría de las mujeres. El tratamiento se continuó durante 50 días, y se monitorizó la progresión del cáncer por el peso corporal de los animales como una indicación del desarrollo de ascitis. (La ascitis es un término que describe la acumulación anormal en el abdomen de líquido que contiene células tumorales que flotan libremente.) En este sistema, la progresión tumoral en la cavidad peritoneal es inicialmente lenta pero luego progresa rápidamente, con el desarrollo final de la ascitis tumoral. El peso corporal de los animales de control aumentó rápidamente alrededor del día 70 (figura 12A), y para el día 129 todos los ratones de control habían muerto (figura 12B). El peso corporal de los animales tratados con 0,1 nmol/g no aumentó más allá de la tasa de crecimiento normal y los 8 animales estaban vivos el día 110, 20 días después del final del tratamiento (figura 12B), y 4 de los 8 todavía estaban vivos el día 150. Un animal que se trató con 1 nmol/g murió durante el tratamiento (cerca del día 80) pero solo murió uno más hasta el día 130. Después del final del tratamiento, el peso de los animales finalmente aumentó, lo que sugería que el tratamiento con svL4 suprimía el desarrollo de la ascitis pero no eliminaba los tumores. Sin embargo, cinco semanas después de dejar el tratamiento, parecía que los ratones supervivientes estaban bien. Es posible que el tratamiento continuado suprima la formación de ascitis de forma indefinida. De manera importante, La mayoría de los ratones siguieron vivos semanas después de dejar el tratamiento, lo que sugería el desarrollo de células B de memoria.

55 En la actualidad se está evaluando una amplia gama de enfoques de inmuno-modulación para el tratamiento del cáncer de ovario, incluyendo una serie de anticuerpos monoclonales tales como α -CTLA-4 (ipilimumab), α -CA-125 (oregovomab) y α -PD-L1 [Tse et al, 2014]. Los primeros resultados de estudios clínicos han sido en su mayoría decepcionantes porque a los pacientes se les suele diagnosticar la enfermedad en un estadio tardío. Como se muestra en la figura 12, el svL4 controló el cáncer de ovario en estadio tardío, posiblemente indefinidamente, y por lo tanto debe ser un complemento oportunista de los anticuerpos de bloqueo de puntos de control. Esta terapia combinada debería rescatar la inmunoterapia con anticuerpos de los límites de uso como un régimen adyuvante a

corto plazo.

En la tabla 4 se muestra la comparación de todos los tratamientos, las tres dosis y las dos frecuencias de administración (lunes/miércoles, MW, o cada dos días, Q2D). La comparación de la supervivencia media mostró que

5

Tabla 4. Mediana de supervivencia en días y porcentaje de animales que sobreviven a los 100, 120 y 140 días después de la inyección de células cancerígenas.

	PBS Q2D	PBS MW	svL4 0,1 nmol/g Q2D	svL4 0,1 nmol/g MW	svL4 1,0 nmol/g Q2D	svL4 1,0 nmol/g MW	svL4 10 nmol/g Q2D	svL4 10 nmol/g MW
Mediana de la supervivencia (días)	108,5	114,5	146,0	126,0	130,0	137,5	137,5	132,5
% de supervivencia a los 100 días	62,5	75,0	100	100	87,5	100	87,5	87,5
% de supervivencia a los 120 días	25,0	25,0	87,5	75,0	75,0	62,5	75,0	87,0
% de supervivencia a los 140 días	0	0	50,0	12,5	12,5	50	50	37,5

10

Es importante señalar que durante y después de la administración del medicamento no hubo ningún cambio en el peso o en el comportamiento del ratón, que indica que no hay una toxicidad manifiesta relacionada con el tratamiento. La inyección repetida del medicamento en la misma región no produjo ninguna irritación aparente ni la formación de tejido fibroso o granulomatoso. Además, los intentos de detectar la unión de péptidos al suero de ratones tratados durante 100 días con svL4 fueron negativos, lo que sugiere que el péptido no es antigénico en los ratones.

15

9. Eficacia de las inyecciones intravenosas de svL4 en perros con una variedad de cánceres

En un estudio preliminar del efecto de dosis bajas de svL4 en perros con varios cánceres, las inyecciones semanales de svL4 tetravalente por sí solas fueron eficaces para prolongar significativamente la vida más allá de la que proporcionan los medicamentos quimioterapéuticos estándar, incluso cuando se combina con el svL4 (figura 13). Estos datos sugieren que los medicamentos quimioterapéuticos interfieren con la acción inmunoestimuladora de svL4. Por tanto, es mejor usar esta combinación de inmunoterapia sin quimioterapia. Por tanto, sería ventajoso proporcionar el svL4 y α -CTLA-4 o α -PD-1 como una mezcla en una sola inyección. Las dosis de cada componente pueden ajustarse individualmente para obtener un beneficio óptimo, por ejemplo, con una frecuencia de inyecciones semanal.

25

Referencias

30

1. Curan MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. 2010. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. Proc Natl Acad Sci USA 107:4274-4280.
2. Degli-Esposti MA, Smyth MJ. 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. Nat Rev Immunol 5:112-124.
3. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, and 10 co-authors. 2010. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. Am J Transplant 10:2410-2420.
4. Eggink LL, Hooper JK. 2009. A biologically active peptide mimetic of N-acetylgalactosamine/galactose. BMC Res Notes 2:23.
5. Eggink LL, Hooper JK. 2010. Peptide mimetics of terminal sugars of complex glycans. Glycobiol Insights 2:63-74.
6. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J. Exp. Med. 192: 1027-1034.
7. Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. 2009. Endogenous ligands for C-type lectin receptors: the true regulators of immune homeostasis. Immunol Rev 230:22-37.
8. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. 2009. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. Nature Rev Immunol 9:465-479.
9. Hanahan D, Weinberg, RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144:646-674.
10. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. EMBO J. 11: 3887-3895.
11. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:12293-12297.
12. Joannes FM, Idema AJ, Bol KF, and 7 co-authors. 2009. Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway

55

mediate immune suppression in malignant brain tumors. *Neuro-Oncology* 11 :394-402.

13. Kushchayev SV, Sankar T, Eggink LL, Kushchayeva YS, Wiener PC, Hooper JK, Eschbacher J, Liu R, Shi F-D, Abdelwahab M, Scheck AC, Preul MC. 2012. Monocyte galactose/N-acetylgalactosamine specific C-type lectin receptor stimulant immunotherapy of an experimental glioma. Part 1: stimulatory effects on blood monocytes and monocyte-derived cells of the brain. *Cancer Manag Res* 20:309-323.
- 5 14. Kushchayev SV, Sankar T, Eggink LL, Kushchayeva YS, Wiener PC, Hooper JK, Eschbacher J, Liu R, Shi F-D, Abdelwahab M, Scheck AC, Preul MC. 2012. Monocyte galactose/N-acetylgalactosamine-specific C-type lectin receptor stimulant immunotherapy of an experimental glioma. Part II: combination with external radiation improves survival. *Cancer Manag Res* 20:325-334.
- 10 15. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2: 261-268.
- 15 16. McNeill L, Salmond RJ, Cooper JC, and 6 co-authors. 2007. The differential regulation of Lck kinase phosphorylation sites by CD45 is critical for T cell receptor signaling responses. *Immunity* 27:425-437.
17. Manda K, Glasow A, Paape D, Hildebrandt G. 2012. Effects of ionizing radiation on the immune system with special emphasis on the interaction of dendritic cells and T cells. *Frontiers Oncol* 2:article 102.
18. Quezada SA, Peggs KS, Curran MA, Allison JP. 2006. CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J Clin Invest* 116:1935-1945.
- 20 19. Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace JL, Tawfik O, Persons DL, Smith PG, Terranova PF. 2000. Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* 21:585-591.
20. Roskoski R Jr. 2005. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 331:1-14.
- 25 21. Sim GC, Martin-Orozco N, Jin L, and 8 co-authors. 2014. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS+ Treg expansion in melanoma patients. *J Clin Invest* 124:99-110.
22. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz, 11 additional co-authors. 2013. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210:1695-1710.
- 30 23. Sonnenschein C, Soto AM, Rangarajan A, Kulkarni P. 2014. Competing views on cancer. *J Biosci* 39:281-302.
24. Streng-Ouwehand I, Unger WWJ, van Kooyk Y. 2011. C-type lectin receptors for tumor eradication: future directions. *Cancers* 3:3169-3188.
25. Teicher BA. 2006. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther* 5:2435-2443.
- 35 26. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, and 18 co-authors. 2014. Survival, durable tumor remission, and longterm safety in patients with advanced melanoma receiving Nivolumab. *J Clin Oncol* 32:1020-1030.
27. Trowbridge IS, Thomas ML. 1994. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12:85-116.
28. Tse BWG, Collins A, Oehler MK, Zippelius A, Heinzlmann-Schwarz VA. 2014. Antibody-based immunotherapy for ovarian cancer: where are we at? *Ann Oncol* 25:322-331.
- 40 29. van Vliet SJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y. 2006. Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45. *Nature Immunol* 7:1200-1208.
30. van Vliet SJ, Saeland E, van Kooyk Y. 2008. Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function. *Trends Immunol* 29:83-90.
31. Weber, J. 2010. Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancerpreclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin. Oncol.* 37 (5): 430-439.
- 45 32. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, and 21 co-authors. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 369:122-33.
33. Zhao J, Zhao J, Perlman S. 2012. Differential effects of IL-12 on Tregs and non-Treg T cells: roles of IFN- γ , IL-2 y IL-2R. *PLoS ONE* 7:e46241.
- 50 34. Zeng J, See AP, Phallen J, and 18 co-authors. 2013. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produces long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 86:343-349.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> Susavion Biosciences, Inc.
- <120> Tratamientos y composiciones de inmunoterapia
- <130> 24667,033
- 60 <150> 62/094.944
- <151> 19/12/2014
- <160> 3
- 65 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 781 673 T3

5 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

10 <400> 1

Val Gln Ala Thr Gln Ser Asn Gln His Thr Pro Arg
 1 5 10

15 <210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 2

Gly Gly Gly Ser
 1

25 <210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 3

35 Val Gln Ala Thr Gln Ser Asn Gln His Thr Pro Arg Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Lys Lys Asn His
 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un péptido y un primer anticuerpo, en donde el péptido tiene una secuencia activa representada por la SEQ ID NO:1, y el anticuerpo es contra una proteína de punto de control inmunológico seleccionada del grupo que consiste en: CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2.
- 10 2. Una composición para su uso en la activación de una respuesta inmunológica en un sujeto, en donde la composición comprende un péptido y un primer anticuerpo, en donde el péptido tiene una secuencia activa representada por la SEQ ID NO:1, y el primer anticuerpo es contra una proteína de punto control inmunológico seleccionada del grupo que consiste en: CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2.
- 15 3. Un kit para activar la respuesta inmunológica, que comprende:
un péptido que tiene una secuencia activa representada por la SEQ ID NO:1; y
un primer anticuerpo contra una proteína de punto de control inmunológico seleccionada del grupo que consiste en: CTLA-4, PD-1, PD-L1 y PD-L2.
- 20 4. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de la reivindicación 1, 2, o 3 en donde el péptido tiene una estructura establecida en la SEQ ID NO:3.
- 25 5. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un segundo anticuerpo, en donde el segundo anticuerpo es contra una proteína de punto de control inmunológico de una ruta de control inmunológico diferente de la del primer anticuerpo.
- 30 6. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido y el primer anticuerpo están en una cantidad suficiente para tratar el cáncer en un sujeto que tiene cáncer.
- 35 7. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de la reivindicación 6, en donde el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de riñón o cáncer de piel.
- 40 8. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de la reivindicación 7, en donde el cáncer es un adenocarcinoma colorrectal, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata refractario a hormonas, carcinoma ovárico epitelial, adenocarcinoma de ovario, melanoma, mesotelioma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de pulmón microcítico o carcinoma de células renales.
- 45 9. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el péptido y el primer anticuerpo están en una cantidad suficiente para tratar infecciones derivadas de virus, micobacterias o parásitos.
- 50 10. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido y el primer anticuerpo están en una cantidad suficiente para suprimir la población de células T reguladoras en los tumores.
- 55 11. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido y el primer anticuerpo están en una cantidad suficiente para incrementar la población de células T efectoras.
- 60 12. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido y el primer anticuerpo están en una cantidad suficiente para aumentar los niveles de al menos una citocina anticancerosa seleccionada del grupo que consiste en: IL-2, IL-12p70, IL-21, IL-27, TNF α e IFN γ .
13. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad del péptido y la cantidad del primer anticuerpo es una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para activar una respuesta inmunológica en un sujeto.
14. La composición farmacéutica, composición para su uso o kit de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

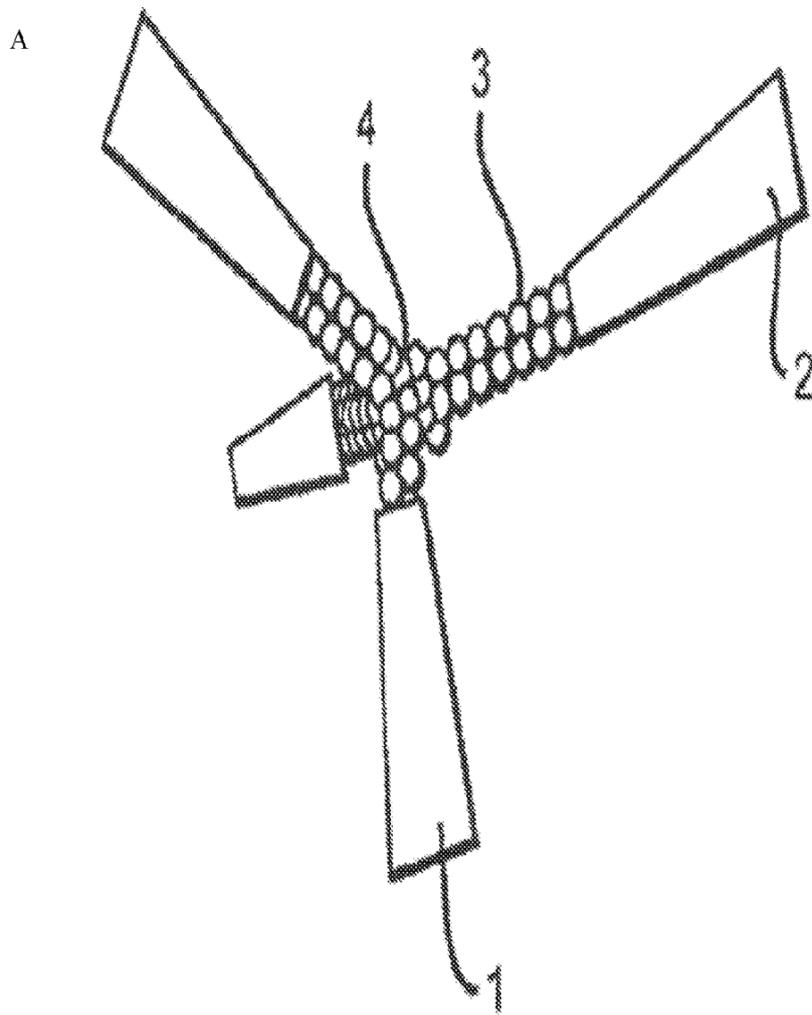


Figura 1

B

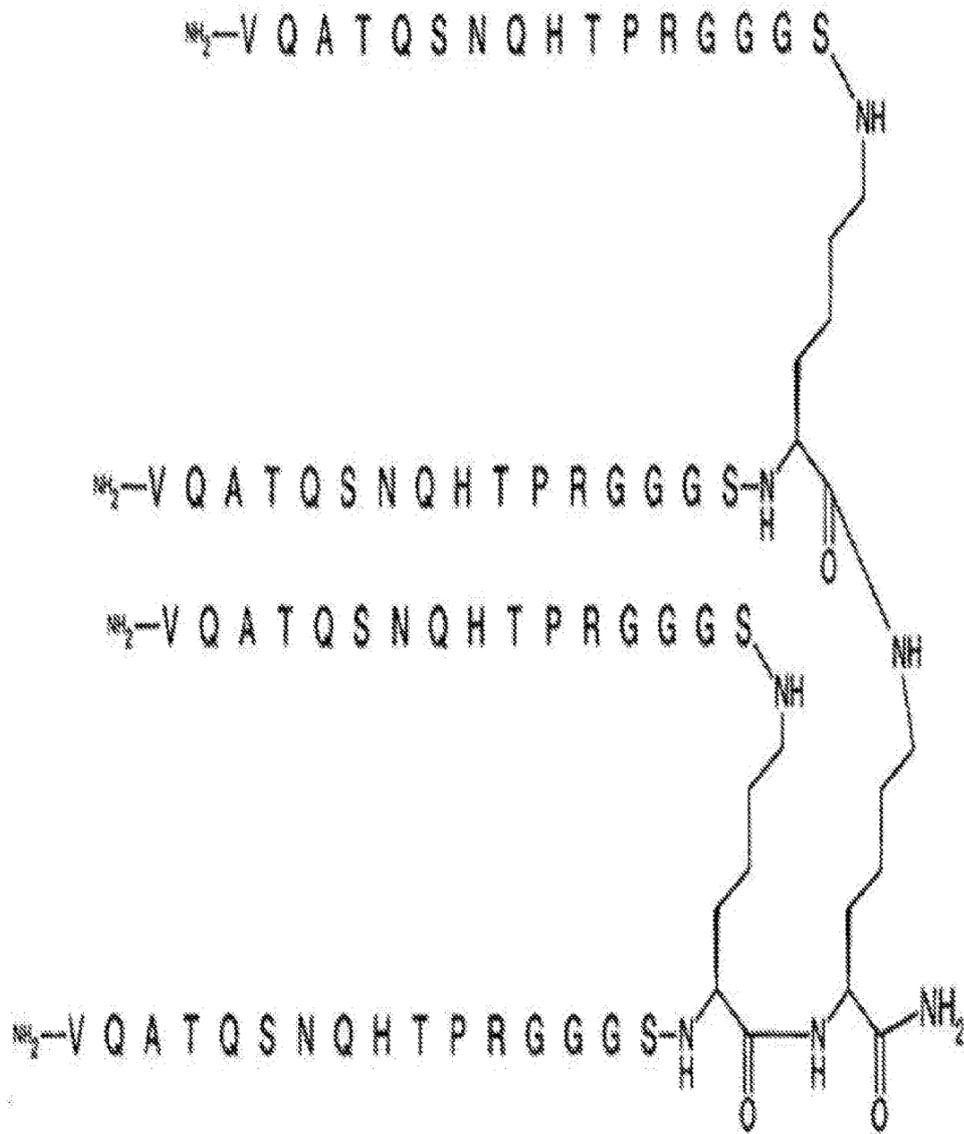


Figura 1 (continuación)

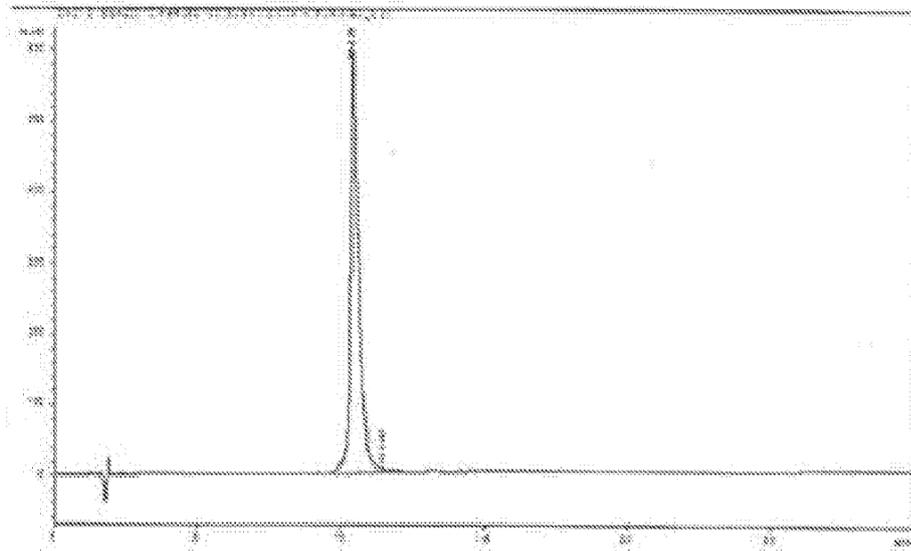


Figura 2

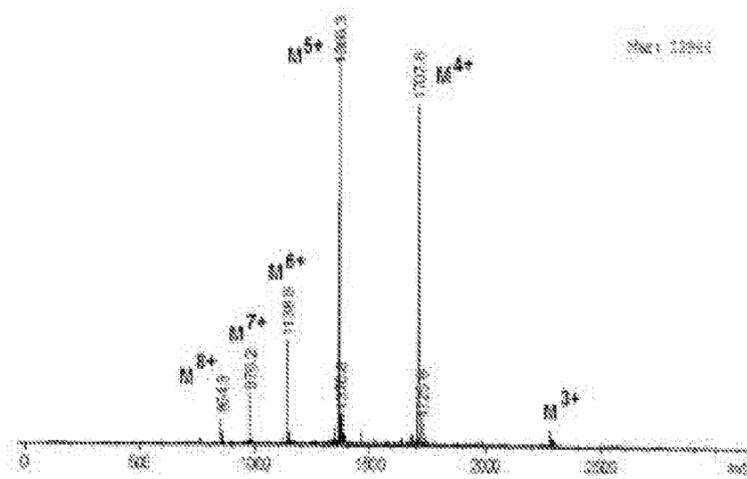


Figura 3

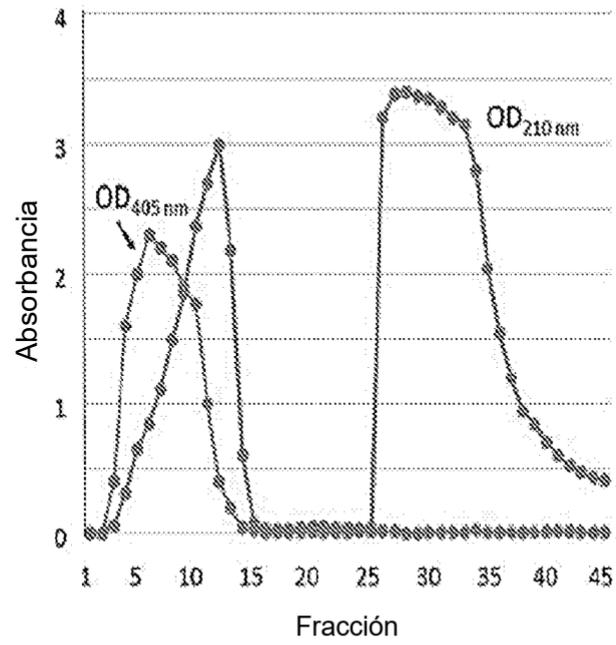


Figura 4

Figura 5

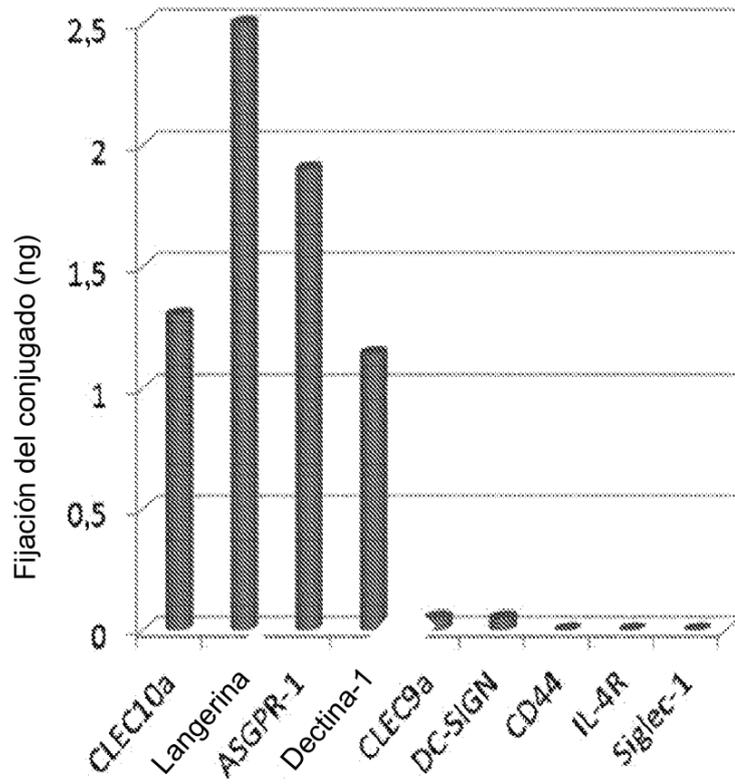
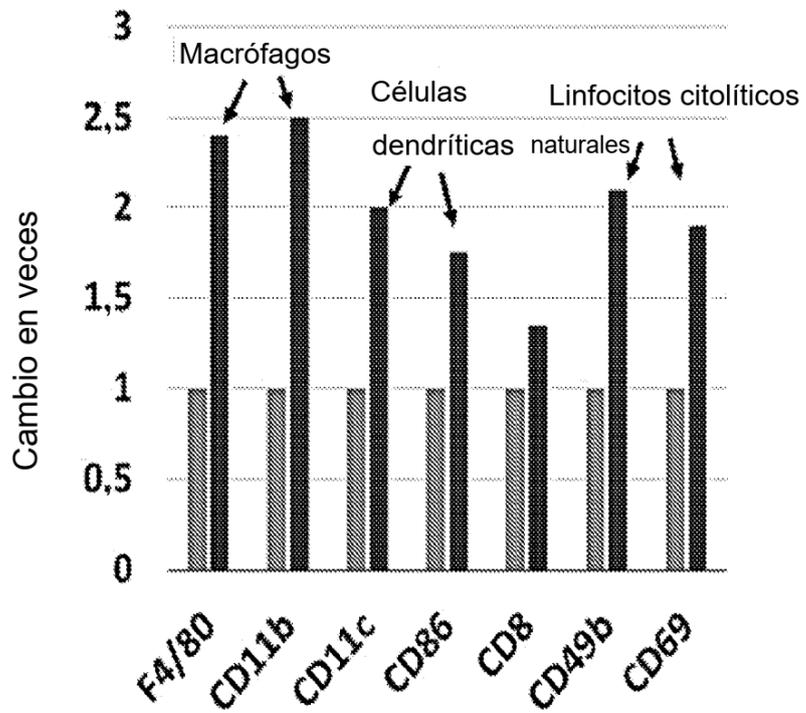


Figura 6



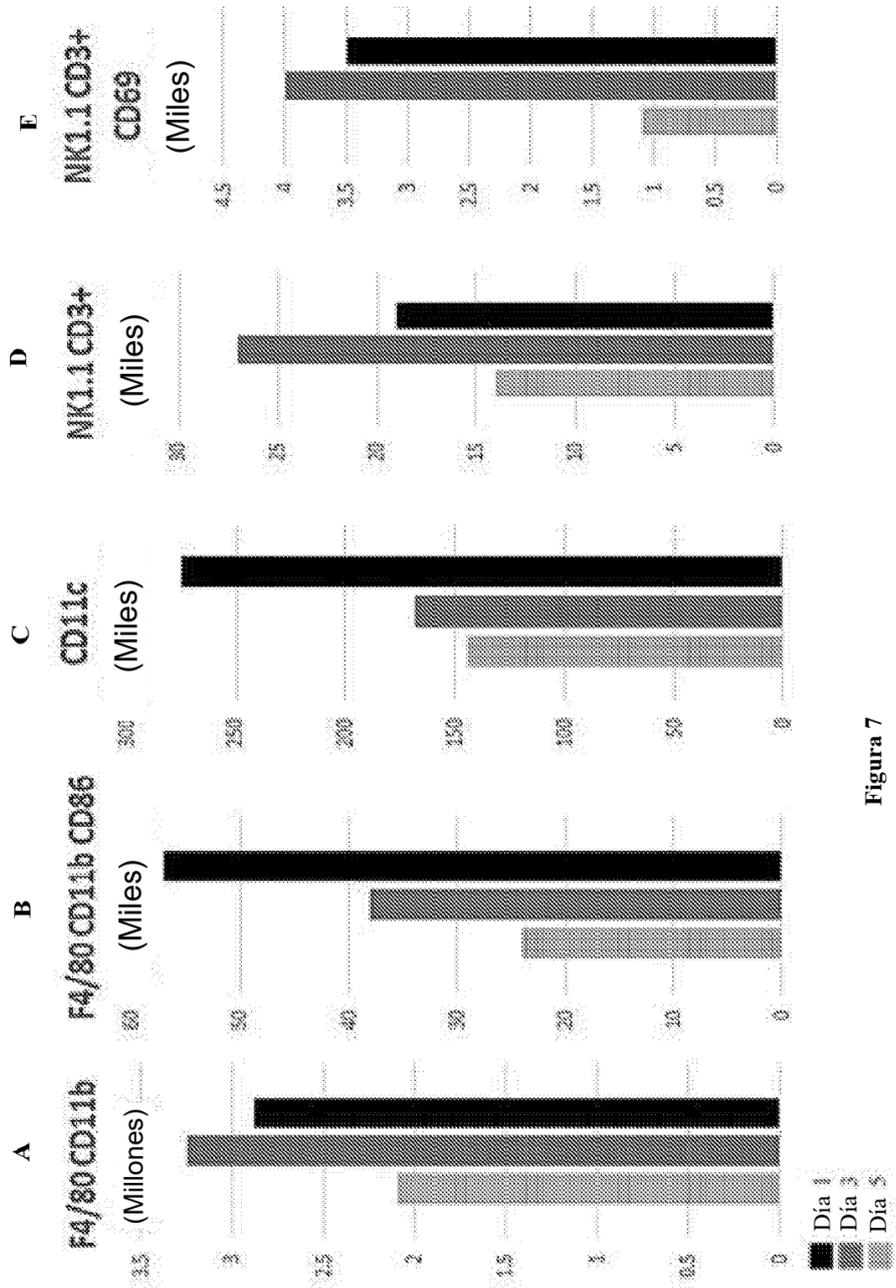


Figura 7

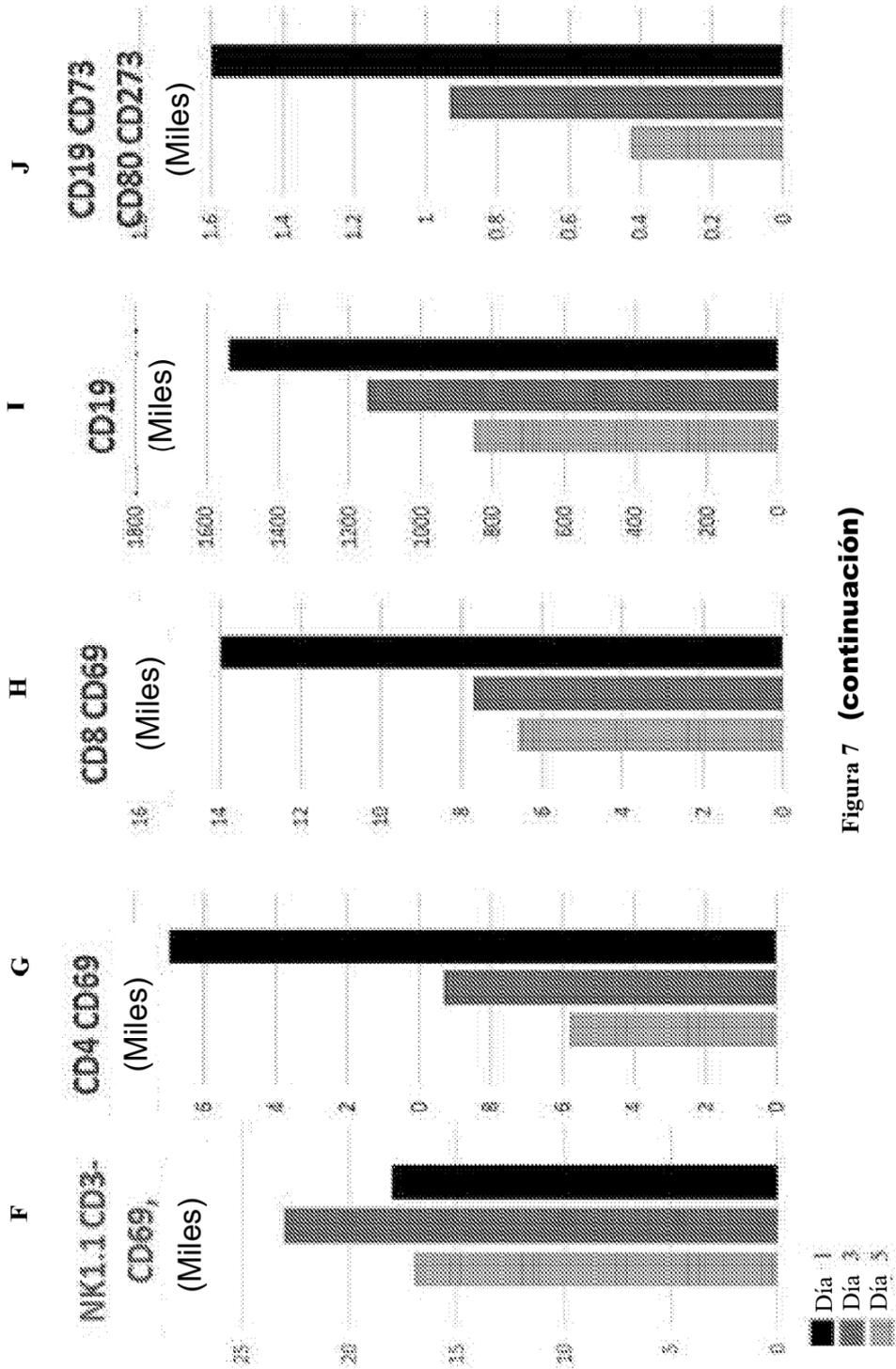


Figura 7 (continuación)

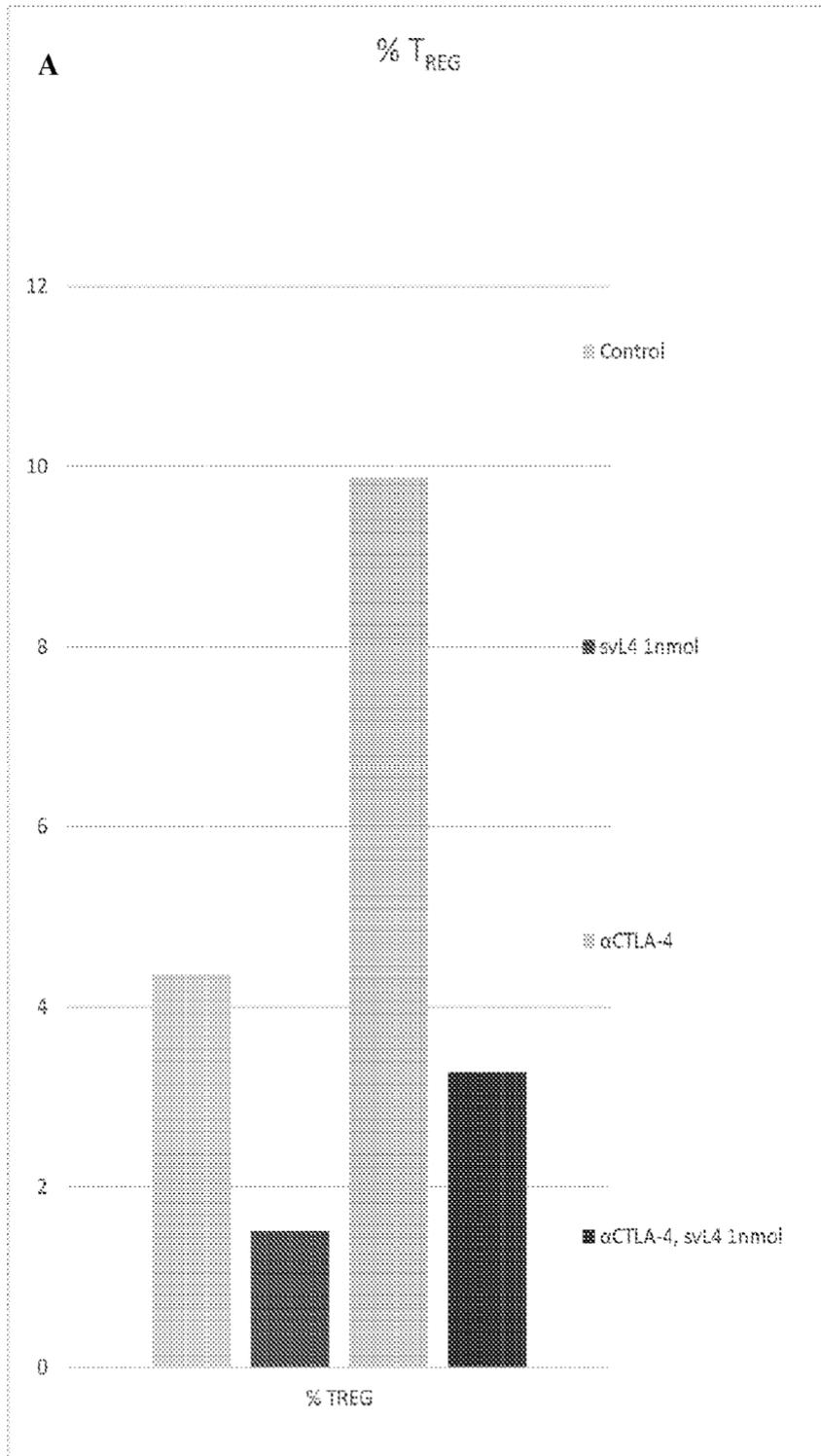


Figura 8

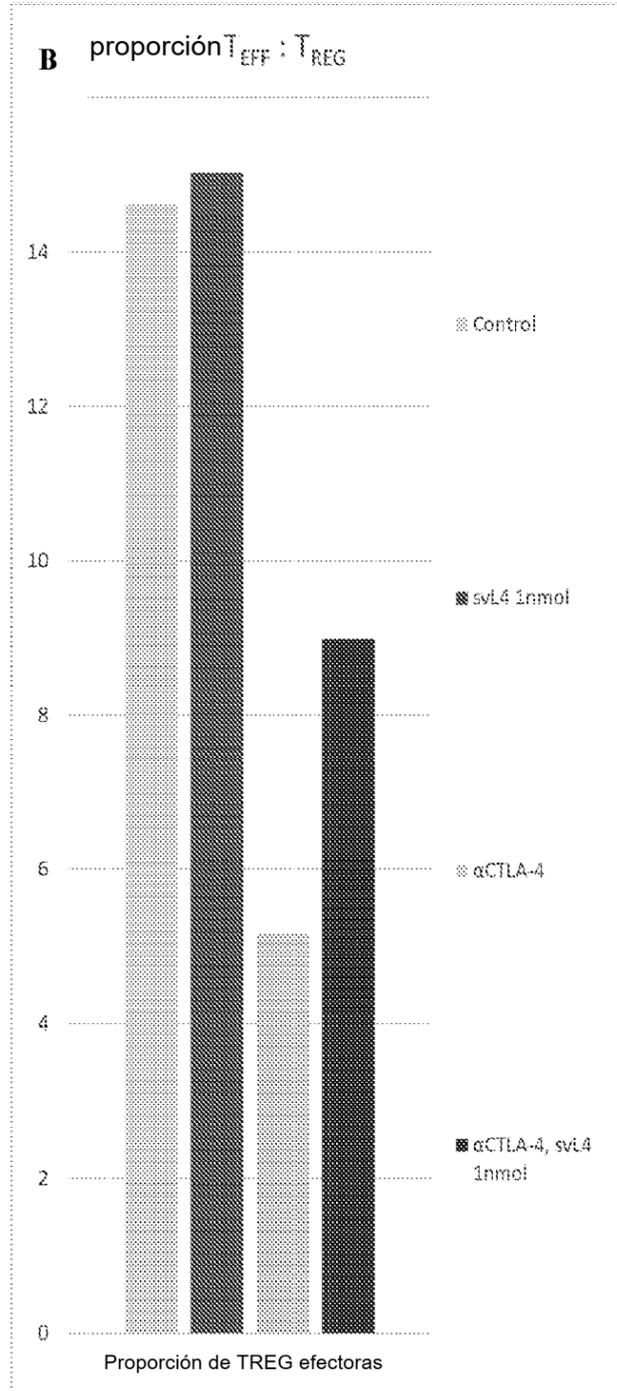
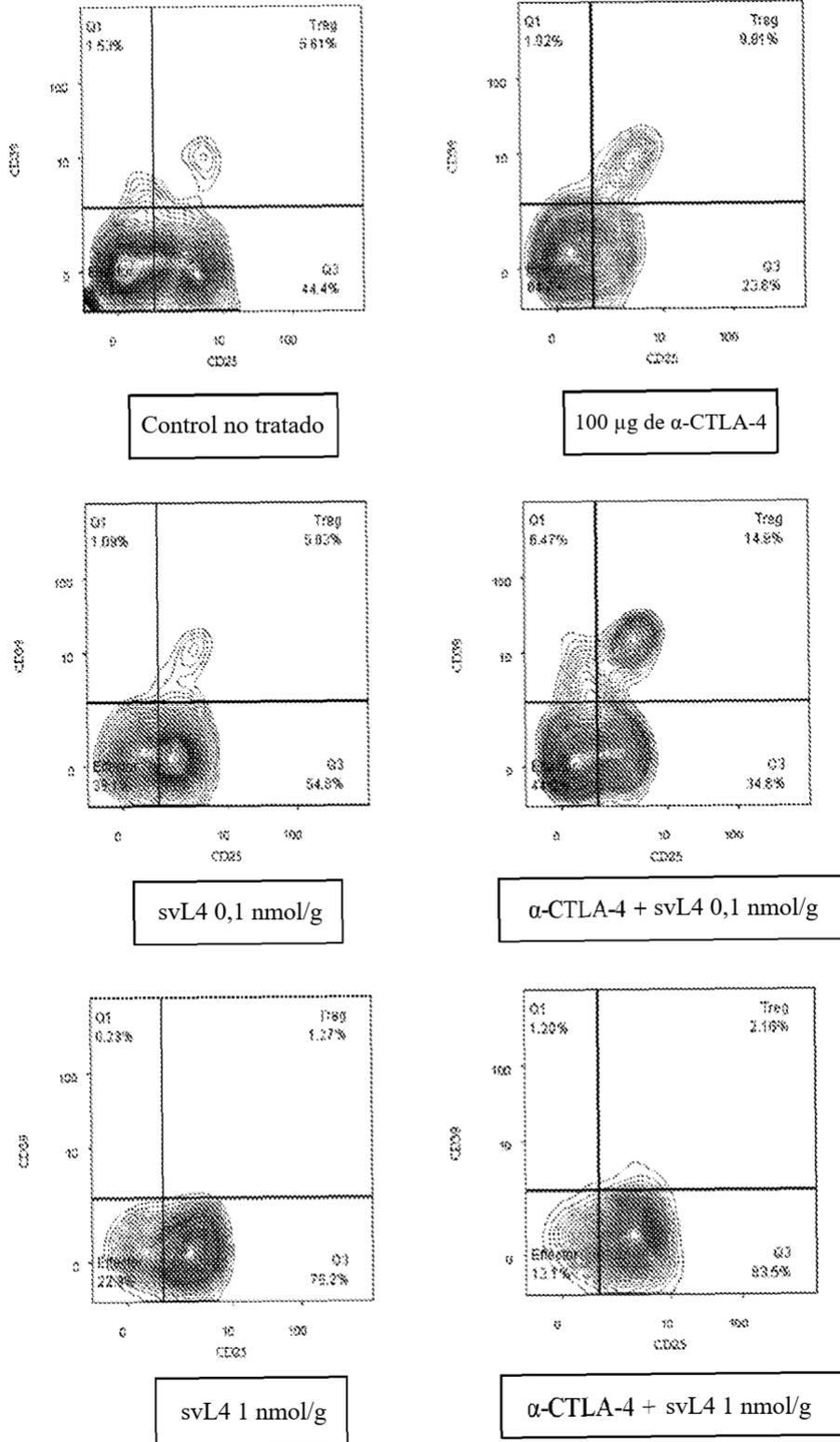


Figura 8 (continuación)

Figura 9



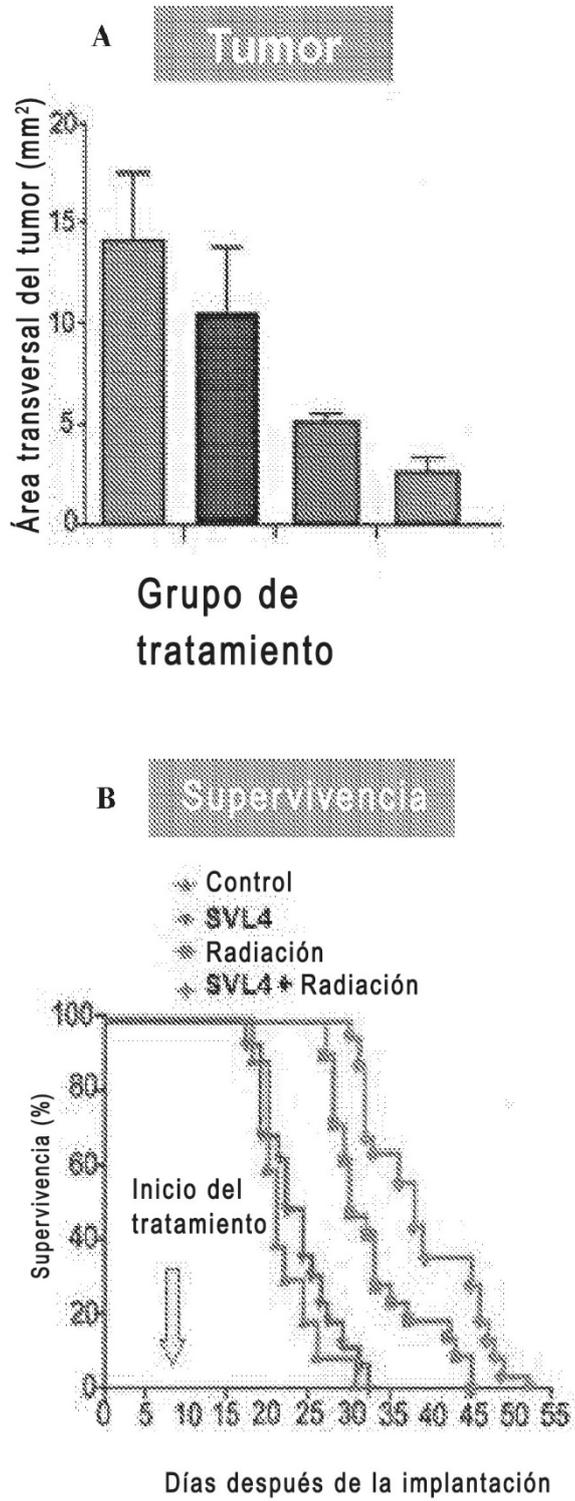


Figura 10

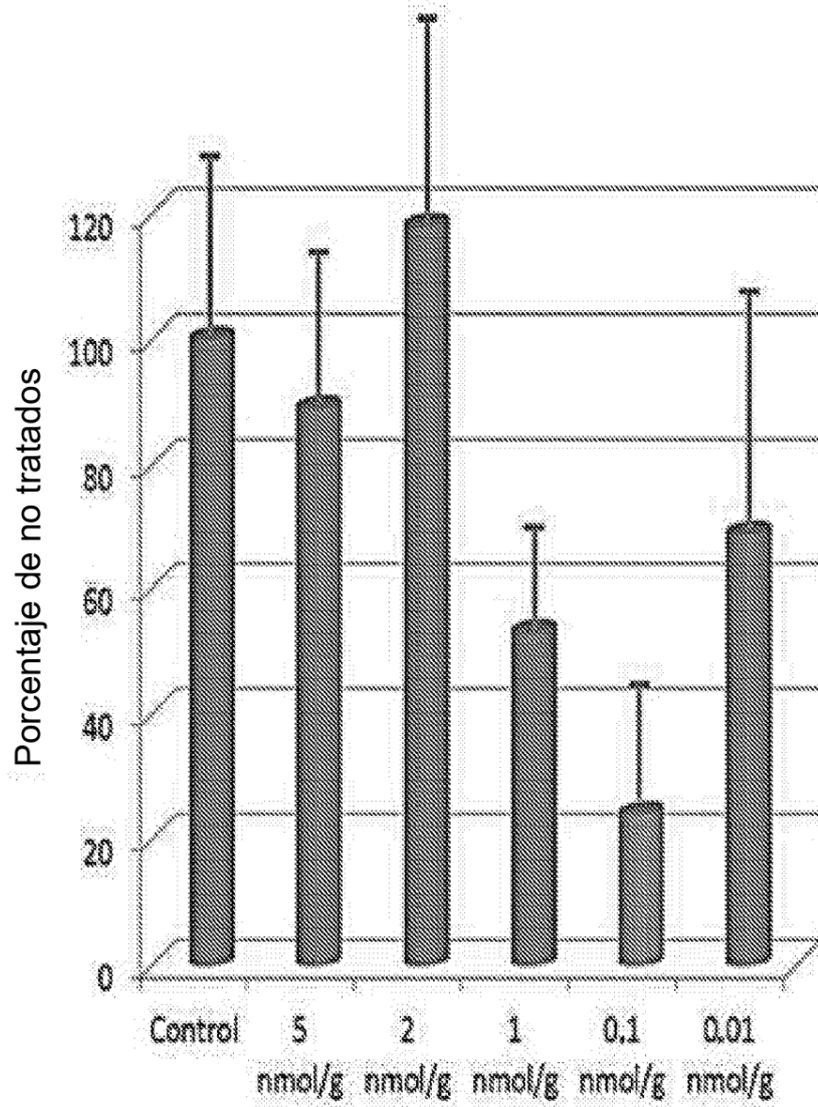


Figura 11

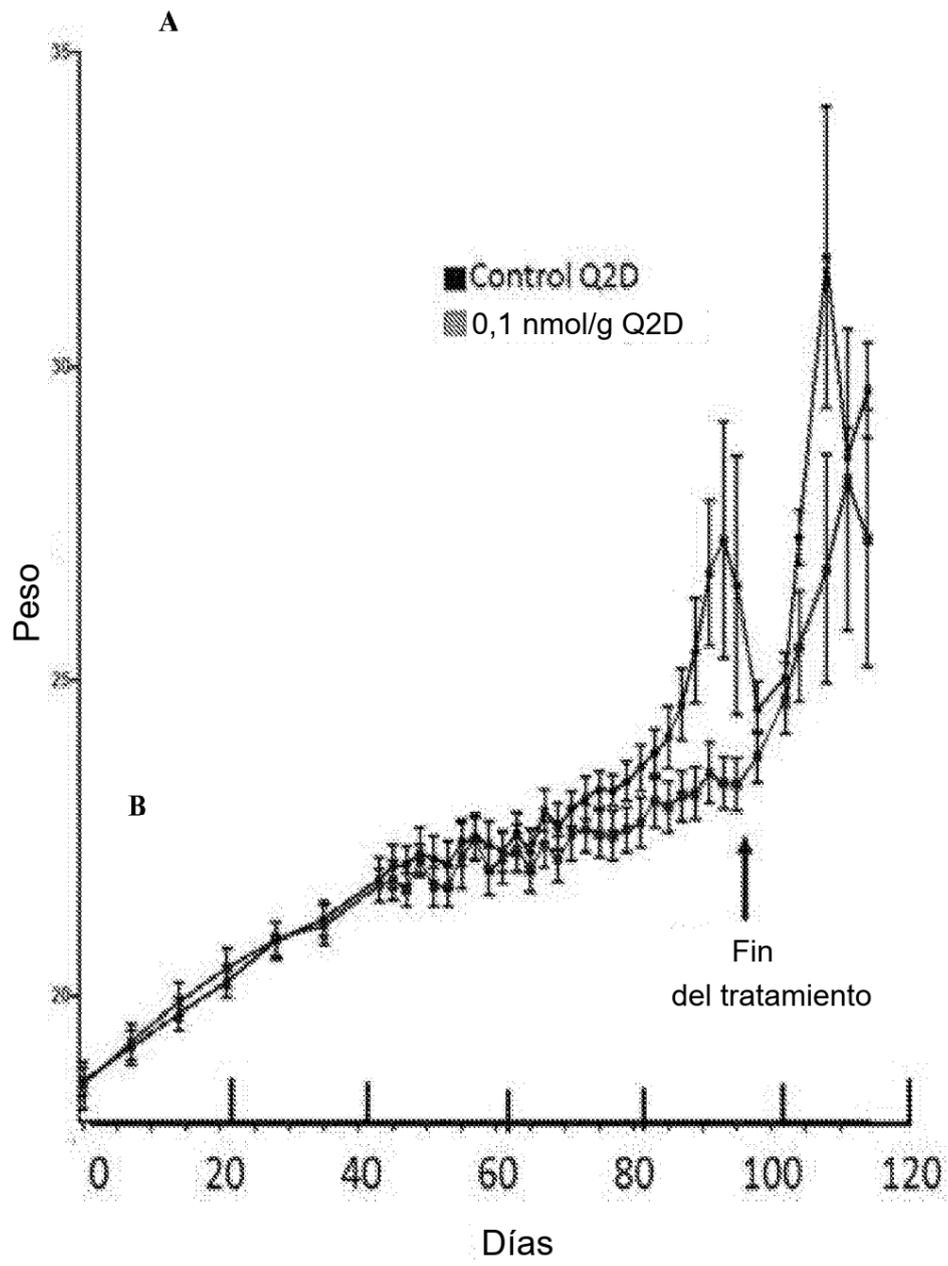


Figura 12

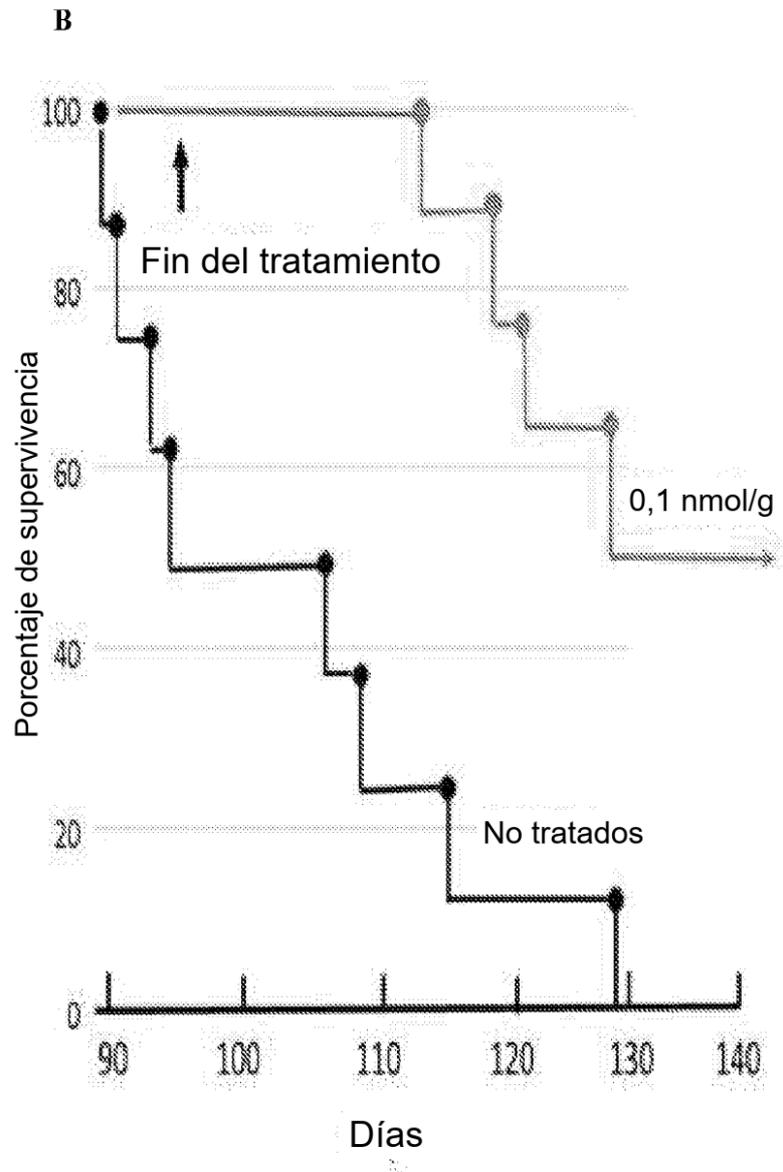


Figura 12 (continuación)

Supervivencia con tratamiento de svL4 de pacientes caninos con cáncer

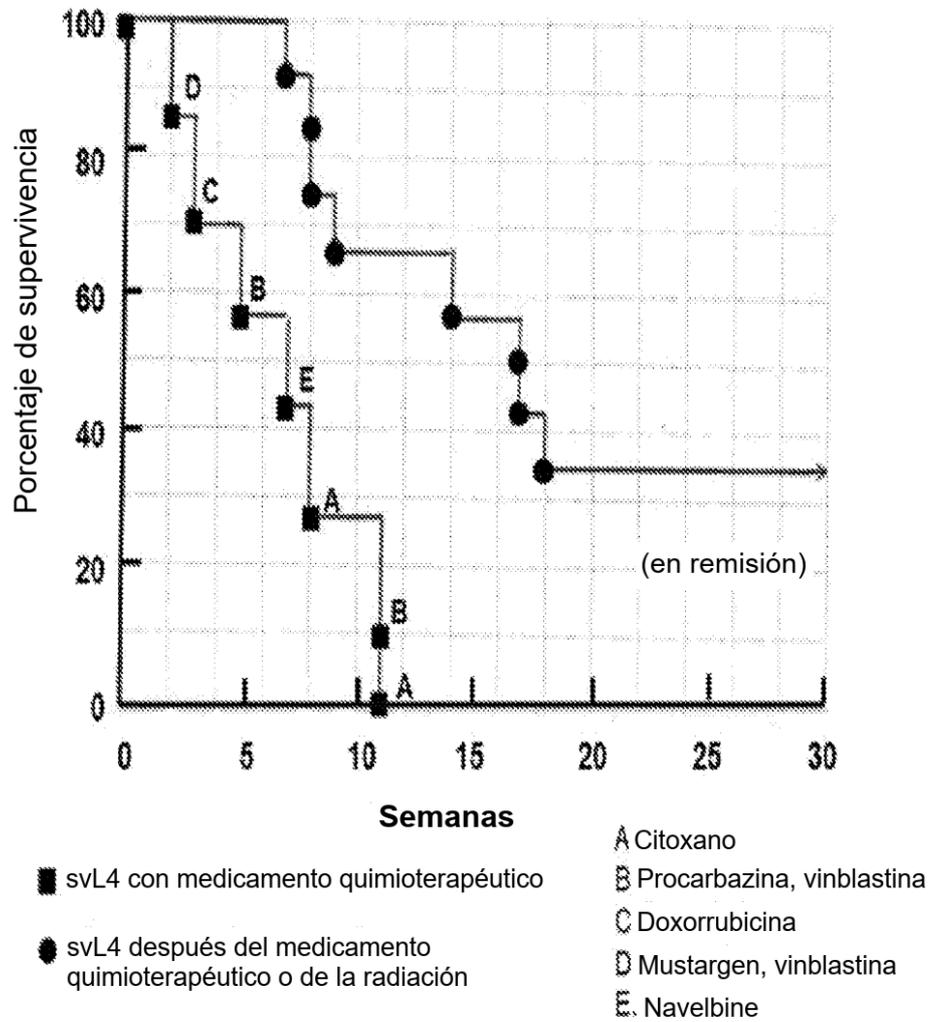


Figura 13