



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014015940-8 B1



(22) Data do Depósito: 14/09/2012

(45) Data de Concessão: 09/08/2022

(54) Título: POLISSACARÍDEO DE GRAU FARMACÊUTICO, COMPOSIÇÃO, E SEUS USOS

(51) Int.Cl.: A61K 31/738; A61K 31/70; A61K 31/715; A61K 45/06; A61P 1/16; (...).

(30) Prioridade Unionista: 28/12/2011 US 61/580,830.

(73) Titular(es): GALECTIN THERAPEUTICS, INC..

(72) Inventor(es): ELIEZER ZOMER; PETER G. TRABER; ANATOLE A. KLYOSOV; ELENA CHEKHOVA.

(86) Pedido PCT: PCT US2012055311 de 14/09/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/101314 de 04/07/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/06/2014

(57) Resumo: POLISSACARÍDEO DE GRAU FARMACÊUTICO, COMPOSIÇÃO, E SEUS USOS. A presente invenção refere-se a composições para uso no tratamento de doenças dependentes de galectina. Em particular, composições compreendendo um galactoarabino-ramnogalacturonato seletivamente despolimerizado, ramificado de que a cadeia principal é predominantemente compreendida de porções de ácido galacturônico 1,4-ligado (GalA), com uma composição de cadeia principal inferior de alternar GalA 1,4-ligado e ramnose 1,2-ligada (Rha), que sucessivamente é ligada a qualquer número de cadeias laterais, incluindo predominantemente resíduos de 1,4-b-D-galactose (Gal) e 1,5- (alfa)-L- arabinose (Ara).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**POLISSACARÍDEO DE GRAU FARMACÊUTICO, COMPOSIÇÃO, E SEUS USOS**".

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício de e prioridade para Pedido Provisório No. de Série US 61/580,830, depositado em 28 de dezembro de 2011, a descrição total do qual está incorporada aqui por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção se refere a um polissacarídeo de grau farmacêutico, composições farmacêuticas do mesmo e a métodos de fabricar o mesmo. Outros aspectos da invenção se referem a métodos de tratar condições de doença, tais como condições médicas relacionadas a inflamação e fibrose e câncer ligados pelo menos em parte a expressão aberrante ou aumentada de proteínas de galectina, usando estes compostos e composições.

ANTECEDENTE DA INVENÇÃO

[003] Plantas e produtos de planta foram usados por muitos anos para derivar produtos farmacêuticos, frequentemente na forma de moléculas orgânicas complexas específicas que têm função fisiológica em animais e em seres humanos. Além de moléculas específicas simples, os componentes estruturais da célula de planta, que são moléculas de carboidrato grandes, complexas, foram explorados para vários efeitos em animais e em seres humanos em fisiologia normal e doença. Entre os carboidratos complexos que compõem as paredes celulares de células de planta, pectinas representam uma classe de moléculas que foram extensivamente examinadas.

[004] Para avaliar o efeito de pectinas na circulação sistêmica e órgãos de animais e seres humanos, tentativas foram feitas para desenvolver pectinas modificadas que poderiam ser utilizadas como

compostos medicinais.

[005] Desta maneira, há uma necessidade para fornecer pectinas modificadas e método de fabricar pectinas modificadas para uso como compostos medicinais parenterais ou enterais. Além disso, há uma necessidade por estes compostos terem as propriedades farmacológicas requeridas para inibir inflamação e fibrose enquanto permanecendo não tóxico a outras células e tecidos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] Aspectos da invenção se referem a um composto ou composição compreendendo um composto em um veículo farmacêutico aceitável para administração parenteral ou enteral, para uso em formulações terapêuticas.

[007] Em algumas modalidades, o composto é um polissacarídeo e pode ser quimicamente definido como arabinogalacto-ramnogalacturonano (aqui referido como Composto G), um heteropolímero seletivamente despolimerizado, ramificado cuja coluna vertebral é compreendida predominantemente de ácido galacturônico 1,4-ligado (GalA) e resíduos de galacturonato de metila (MeGalA), com uma composição de coluna vertebral menor de alternar GalA 1,4-ligado e ramnose 1,2-ligado (Rha), que sucessivamente é ligado a qualquer número de cadeias laterais de oligômero, incluindo predominantemente resíduos de 1,4- β -D-galactose (Gal), 1,5- α -L-arabinose (Ara) ou combinação dos mesmos. Outros componentes menores de cadeia lateral podem incluir xilose (Xyl), glicose (Glu), fucose (Fuc) ou qualquer combinação do anterior.

[008] Em algumas modalidades, o composto de arabinogalacto-ramnogalacturonano da presente invenção (Composto G) é capaz de reduzir a secreção de citocina TNF-alfa a partir de monócitos ressaltado com endotoxina. Em algumas modalidades, o composto G é capaz de reduzir a secreção de TNF alfa por macrófagos ativados antes de

pelo menos 25%.

[009] Em algumas modalidades, o ácido galacturônico 1,4-ligado e cadeia principal de resíduos de galacturonato de metila podem representar entre 55 a 85 por cento molar do teor molar de carboidrato total, o heteropolímero ramificado de ramnose α -1,2 ligado alternada e resíduos de GalA α -1,4-ligados podem representar entre 1 e 6 por cento molar do teor molar de carboidrato total, o oligômero 1,4- β -D-galactose da ramificação primária pode representar entre 6 a 15 por cento molar do teor molar de carboidrato total e o oligômero 1,5 - α - L-arabinose da ramificação primária pode representar entre 2 a 8 por cento molar do teor molar de carboidrato total, como caracterizado por cromatografia de gás e/ou espectrometria de massa.

[0010] Em algumas modalidades, o oligômero de resíduos de 1,4- β -D-galactose, resíduos de 1,5- α -L-arabinose ou combinações dos mesmos representam pelo menos 8 por cento molar do teor molar de carboidrato total.

[0011] Em algumas modalidades, os resíduos de 1,4- β -D-galactose e 1,5- α -L-arabinose estão presentes em uma relação de 2:1 a 3:1 no composto de arabinogalacto-ramnogalacturonano da presente invenção.

[0012] Em algumas modalidades, o composto da presente invenção tem um grau de metoxilação variando de 40% a 70% do máximo de 87%.

[0013] Em algumas modalidades, o composto da presente invenção tem uma relação de galacturonato de metila para ácido galacturônico variando de 2:1 a 1:2.

[0014] Em algumas modalidades o composto da presente invenção tem uma relação de galacturonato de metila mais ácido galacturônico para galactose variando de 4:1 a 7:1.

[0015] Em algumas modalidades, o percentual molar dos resíduos

de 1,4- β -D-Gal e 1,5- α -L-Ara no composto da presente invenção pode exceder 10% dos carboidratos molares totais com relação aproximada variando respectivamente de 1:1 a 3:1.

[0016] Em algumas modalidades, o composto é um polissacarídeo quimicamente definido como galactoarabino-ramnogalacturonato (Composto G), um heteropolímero ramificado com distribuição de peso molecular média de 2.000 a 80.000, ou 20.000 a 70.000, ou 5.000 a 55.000 Dalton, como determinado por método de SEC-RI e/ou SEC-MALLS.

[0017] Em algumas modalidades, o composto pode ser um polissacarídeo modificado altamente solúvel suficientemente reduzido em peso molecular médio, por exemplo de cerca de 2,000 a cerca de 80,000 D, para ser compatível com formulações terapêuticas para administração pluralista por rotinas que incluem porém não limitadas a intravenosas, subcutâneas, intra-articulares, inaladas, e orais.

[0018] Em algumas modalidades, o composto pode estar substancialmente livre de endotoxina microbiana, pesticidas agrícolas, herbicidas agrícolas, cobre, metais pesados, proteínas, compostos nitrogenados ou qualquer combinação do anterior.

[0019] Em algumas modalidades, o composto pode ser sintetizado a partir de pectina de USP natural, altamente ramificada, minimamente processada e metoxilada alta que pode vir de qualquer fonte de planta, incluindo, porém, não limitada a frutas cítricas, maçã, ou beterraba.

[0020] Em algumas modalidades, o composto pode ser sintetizado a partir de pectina de USP natural, altamente ramificada, minimamente processada e metoxilada alta como uma fabricada a partir de bagaço de maçã contendo 8-12% de pectina.

[0021] Em algumas modalidades, o composto pode ser sintetizado sob uma hidrólise suficientemente controlada e específica do um -GalA 1,4-ligado metoxilada ligado glicosídico enquanto preservando as ca-

deias laterais com quantidades enriquecidas de 1,4- β -D-Gal e 1,5- α -L-Ara. Quantidades de 1,4- β -D-Gal e 1,5- α -L-Ara podem ser quantitativamente determinadas por métodos de GC-MS (cromatografia de Gás-espectroscopia de massa) e AELC-PAD (cromatografia líquida de troca iônica-detector amperométrico pulsado).

[0022] Em algumas modalidades o composto pode ser produzido por um processo compreendendo despolimerização catabolizada por clivagem de peroxidação alvejada de ligações glicosídicas por OH sup ionizado - gerado a partir de ácido ascórbico e/ou peróxido na presença ou ausência de forma reduzida adicional de um íon de metal de transição, como Cu sup.++ a 1 a 100 mM. Outros metais de transição como Ca. sup.++ ou Fe.sup.++ podem da mesma forma ser usados para este propósito.

[0023] Em algumas modalidades, compostos despolimerizados podem ser expostos a pH entre 8 a 10 durante 10 a 30 minutos em temperatura de 2 a 60°C para iniciar demetoxilação limitada controlada para gerar um composto de despolimerizado com um grau de metoxilação de 40 a 70 por cento em comparação a níveis iniciais de máximo 87% e pode ser referido como composto meio-metoxilado. Metoxilação completa de ácido galacturônico é considerada ser cerca de DE 87%.

[0024] Em algumas modalidades, a composição despolimerizada pode ser exposta a lavagens múltiplas de álcool ácido quente (por exemplo em temperaturas variando de 30 a 80°C) para remover qualquer endotoxina residual, cobre e metais pesados, contaminantes agrícolas e outras impurezas.

[0025] Em algumas modalidades, o composto não induz viabilidade diminuída quando usado para tratar células estreladas hepáticas humanas imortalizadas LX2.

[0026] Em algumas modalidades, o composto é capaz de reduzir expressão de galectina-3 na superfície celular ou diminuição substancial

cial em secreção de galectina-3 nos meios quando usados para tratar células estreladas hepáticas humanas imortalizadas LX2 enfatizadas produzindo galectina-3.

[0027] Aspectos da invenção se referem a um composto de arabinogalacto-ramnogalcturonano compreendendo um ácido galacturônico 1,4-ligado (GalA) e cadeia principal de resíduos de galacturonato de metila (MeGalA) ligada a heteropolímeros ramificados de oligômeros alternados de ramnose α -1,2 ligada e resíduos de GalA α -1,4-ligados, os resíduos de ramnose transportando uma ramificação primária de oligômeros de resíduos de 1,4- β -D-galactose, resíduos de 1,5- α -L-arabinose, ou combinações dos mesmos, em que o composto é capaz de reduzir a secreção de citocina TNF alfa a partir de monócitos enfatizados com endotoxina, em que o composto não inibe proliferação de célula de câncer em um apoptose de célula de câncer ou um modelo citotóxico, e em que o composto não é citotóxico a monócitos ou monócitos ativados.

[0028] Em algumas modalidades, o composto não inibe proliferação de célula de câncer em uma célula de câncer e não é citotóxico a monócitos ou monócitos ativados em concentrações até 500 µg/mL.

[0029] Em algumas modalidades, o ácido galacturônico 1,4-ligado e a cadeia principal de resíduos de galacturonato de metila podem representar entre 55 a 85 por cento molar do teor molar de carboidrato total, o heteropolímero ramificado de ramnose α -1,2 ligada alternada e resíduos de GalA α -1,4-ligados podem representar entre 1 e 3 por cento molar do teor molar de carboidrato total, o oligômero 1,4- β -D-galactose da ramificação primária pode representar entre 6 a 15 por cento molar do teor molar de carboidrato total e o oligômero 1,5- α -L-arabinose da ramificação primária pode representar entre 2 a 8 por cento molar do teor molar de carboidrato total, como caracterizado por cromatografia de gás e/ou espectrometria de massa.

[0030] Em algumas modalidades, os resíduos de 1,4- β -D-galactose, resíduos de 1,5- α -L-arabinose ou combinação dos mesmos podem representar pelo menos 8 por cento molar do teor molar de carboidrato total.

[0031] Em algumas modalidades, os resíduos de 1,4- β -D-galactose e 1,5- α -L-arabinose podem estar presentes em uma relação de 2:1.

[0032] Em algumas modalidades, o composto pode ter um peso molecular médio variando de 5 kDa a 55 kDa ou variando de 2 kDa a 70 kDa.

[0033] Em algumas modalidades, o composto pode ter um grau de metoxilação variando de 40% a 70% fora do máximo 87%.

[0034] Em algumas modalidades, o composto pode ter uma relação de galacturonato de metila para ácido galacturônico variando de 2:1 a 1:2.

[0035] Em algumas modalidades o composto pode ter uma relação de galacturonato de metila mais ácido galacturônico para galactose variando de 4:1 a 8:1.

[0036] Em algumas modalidades, o composto não induz viabilidade diminuída quando usado para tratar células estreladas hepáticas humanas imortalizadas LX2.

[0037] Em algumas modalidades, o composto é capaz de induzir diminuição substancial em expressão de galectina-3 na superfície celular ou diminuição substancial em secreção de galectina-3 nos meios quando usado para tratar células estreladas hepáticas humanas imortalizadas LX2 enfatizadas produzindo galectina-3.

[0038] Aspectos da invenção se referem a composições comprendendo um composto em um veículo farmacêutico aceitável para uso em formulações terapêuticas. Em algumas modalidades, a composição pode ser administrada parenteralmente por meio de uma rotina

intravenosa, subcutânea, ou oral.

[0039] Em algumas modalidades, a composição pode também compreender um agente terapêutico. Por exemplo, o agente terapêutico pode ser um composto antioxidante, agente anti-inflamatório, vitaminas, um suplemento nutracêutico ou combinações dos mesmos.

[0040] Em algumas modalidades, a composição pode ser usada no tratamento de esteatohepatite não alcoólica, fibrose, distúrbios inflamatórios e autoimunes, condições neoplásicas ou de câncer.

[0041] Em algumas modalidades, a composição pode ser usada no tratamento de fibrose hepática, fibrose renal, fibrose pulmonar, ou fibrose de coração.

[0042] Em algumas modalidades, a invenção se refere a uma composição ou um composto utilizado no tratamento ou um método de tratar distúrbios inflamatórios e fibróticos em que galectinas estão pelo menos em parte envolvidas na patogênese, incluindo, porém, não limitado a atividade antifibrose aumentada em órgãos, incluindo, porém, não limitado a fígado, rim, pulmão, e coração.

[0043] Em algumas modalidades, a invenção se refere a uma composição ou um composto tendo atividade terapêutica ou um método para reduzir a patologia e atividade de doença associada com esteatohepatite não alcoólica (NASH) incluindo, porém, não limitada a esteatose (acúmulo de gordura em hepatócitos), degeneração em balão de hepatócitos, infiltrado inflamatório no fígado, e deposição de colágeno ou fibrose.

[0044] Em algumas modalidades, a invenção se refere a uma composição ou um composto utilizado no tratamento ou um método de tratar distúrbios inflamatórios e autoimunes em que galectinas estão pelo menos em parte envolvidas na patogênese incluindo, porém, não limitado a artrite, artrite reumatóide, asma, e doença inflamatória intestinal.

[0045] Em algumas modalidades, a invenção se refere a uma

composição ou um composto utilizado no tratamento ou um método de tratar condições neoplásicas (por exemplo cânceres) em que galectinas estão pelo menos em parte envolvidas no patogênese inibindo-se processos promovidos pelo aumento em galectinas, incluindo, porém, não limitado a invasão de célula de tumor, metástase, e neovascularização.

[0046] Em algumas modalidades, a invenção se refere a uma composição ou um composto utilizado em aumento ou um método para aumentar a capacidade de tumor que infiltrar células T, que são inibidas pelo menos em parte pelo efeito de proteínas de galectina derivadas de tumor, para mais efetivamente identificar e matar células de tumor e desse modo reduzir, parar ou reverter a progressão de tumores.

[0047] Em algumas modalidades, uma quantidade terapêuticamente eficaz do composto despolimerizado ou da composição pode ser compatível e eficaz em combinação com uma quantidade terapeuticamente eficaz de vários fármacos anti-inflamatórios, vitaminas, outros fármacos farmacêuticos e nutracêuticos, sem limitação.

[0048] Em algumas modalidades, uma quantidade terapêuticamente eficaz do composto despolimerizado ou da composição pode ser compatível e eficaz em combinação com uma quantidade terapeuticamente eficaz de vários compostos antioxidantes tais como glicirrizena, ácido ascórbico, L-glutationa, cisteamina e similar ou combinações dos mesmos.

[0049] Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto ou da composição pode ser não tóxica e não induz apoptose em linhagens celulares cultivadas quando adicionadas a meio de cultura de célula incluindo porém não limitado à linhagens celulares LX-2, ou outras células estreladas.

[0050] Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto ou da composição não é citotóxica a células culti-

vadas de mamífero quando adicionada a meio de cultura de célula incluindo, porém, não limitado a Células de melanoma B16-F10, células de THP-1 monócito/macrófago, células mononucleares de sangue periférico primárias (PBMC) e células de fibroblasto pulmonares MRC-5.

[0051] Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto ou da composição pode ter um efeito anti-inflamatório em linhagens celulares como medido por produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo, porém, não limitado a TNF-alfa.

[0052] Em algumas modalidades, eficácia do composto ou da composição para tratamento de fibrose hepática pode ser determinada administrando-se o composto ou composição a modelos de animal de fibrose incluindo, porém, não limitado a ratos injetados intraperitonealmente com a toxina química tioacetamida, resultando em pelo menos 5% a 25% de redução em teor de colágeno hepática como determinado por quantificação morfométrica.

[0053] Em outra modalidade, eficácia da composição para tratamento de NASH pode ser determinada administrando-se o composto ou composição a modelos de animal de NASH incluindo, porém, não limitado a camundongos tornados diabéticos e alimentados uma dieta hiperlipídica, resultando em pelo menos 5% de redução em acúmulo de gordura hepatocelular, pelo menos uma redução de 5% no número de hepatócitos com degeneração em balão, pelo menos 5% de redução em infiltração hepática de células inflamatórias, e pelo menos uma redução de 5% em teor de colágeno hepática como determinado por quantificação morfométrica (avaliado por manchamento positivo para vermelho Sirius).

[0054] Em outra modalidade, administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto despolimerizado ou da composição a um modelo animal de NASH pode resultar em redução de fibrose como medido por histopatologia padrão de biópsias, redução em ativida-

de de doença graduação de NAFLD, uma diminuição no número de células expressando alfa Actina de Músculo Liso, ou uma diminuição em outros mediadores inflamatórios ou uma diminuição em tráfego de lipídio e enzimas de metabolismo incluindo, porém, não limitado a CD36.

[0055] Em outra modalidade, administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto despolimerizado ou da composição pode resultar em redução de galectina-3 como medido por nível de mRNA ou a expressão da proteína de ligação de galactose.

[0056] Em outra modalidade, administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto despolimerizado ou da composição pode resultar em crescimento reduzido, invasão, metástase, ou sensibilidade aumentada ao sistema imune inato de tumores singênicos ou xenotópicos em animais.

[0057] Estes e outros aspectos da presente invenção se tornarão aparentes em referência à seguinte descrição detalhada.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0058] A presente invenção será também explicada com referência aos desenhos anexos, em que estruturas semelhantes são referidas para por numerais semelhantes ao longo das várias visões. Os desenhos não são mostrados necessariamente em escala, com ênfase em vez de geralmente ser colocados ao ilustrar os princípios da presente invenção.

[0059] As Figuras 1 mostra um esquemático de um fluxograma de processo industrial que pode ser utilizado em uma modalidade para fabricar Composto G, o ingrediente farmacêutico ativo.

[0060] A FIG. 2 mostra uma ilustração da estrutura molecular do Composto G de acordo com algumas modalidades.

[0061] A FIG. 3a mostra um cálculo de plotagem de Zimm de peso molecular médio calculado para o composto seletivamente despolime-

rizado da presente invenção (Composto G) como determinado por método de Analisador de Dispersão a Laser Multi-Angel (MALS). FIG. 3b mostra que um Cálculo de plotagem de Zimm de parâmetros de dn/dc calculados para o composto seletivamente despolimerizado (Composto G) da presente invenção em 10 nM solução tamponada de EDTA como determinado por método de Analisador de Dispersão a Laser Multi-Angel (MALS).

[0062] A FIG. 4a mostra a determinação de distribuição de peso molecular do composto seletivamente despolimerizado (Composto G) da presente invenção usando um método de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). A curva padrão estabelecida por referência a padrões de peso molecular de polissacarídeos (MW) monitorados por detector de Índice Refrativo (RI) que são usados para calcular o peso molecular médio. Fig 4b mostra o perfil do composto seletivamente despolimerizado (Composto G) da presente invenção como caracterizado por detector de Índice Refrativo (RI).

[0063] A FIG. 5a mostra RMN bidimensional (2-D RMN) do espectro combinado de D1 e C13 RMN para Composto G. Este RMN bidimensional descreve uma identificação de impressão digital das ligações glicosídicas do Composto G. FIG. 5b mostra RMN bidimensional (2-D RMN) do espectro combinado de D1 e C13 RMN para Composto S. Figura 5c mostra uma comparação de sobreposição destes espectros demonstrando as diferenças entre Composto G e Composto S. Os sinais circulados são específicos para Composto G.

[0064] A FIG. 6a-d é uma representação de vários tipos de experiências demonstrando a falta de citotoxicidade e apoptose do Composto G em linhagem celular hepática estralada cultivada LX-2. FIG. 6a é um gráfico mostrando a incorporação de timidina radiorrotulada em células de LX-2 cultivadas. FIG. 6b são um gráfico mostrando a avaliação de viabilidade celular em células de LX-2 cultivadas. FIG. 6c des-

creve uma avaliação de apoptose e ciclo celular por FACS em células de LX-2 cultivadas. FIG. 6d mostra uma avaliação de apoptose por fragmentação de DNA em células de LX-2 cultivadas usando *kit* de detecção de apoptose Annexin V APC (eBioscience).

[0065] A FIG. 7 é um gráfico mostrando a citotoxicidade relativa na linhagem celular de monócito/macrófago THP-1 seguindo 3 dias na presença de Composto G da presente invenção (quadrado), Composto D, um produto de galactomanano (diamante) e digitoxina (triângulo).

[0066] A FIG. 8 é um gráfico mostrando a citotoxicidade relativa em linhagem celular de melanoma cultivada B16-F10 seguindo 3 dias na presença de Composto G da presente invenção (diamante), Composto D, um produto de galactomanano (quadrado) e 5-Fluoruracila (triângulo).

[0067] A FIG. 9 é um gráfico mostrando a falta de citotoxicidade do Composto G em células mononucleares de sangue periférico cultivadas (PBMC), uma cultura de célula primária.

[0068] A FIG. 10 é um gráfico mostrando a falta de citotoxicidade em células de crescimento de fibroblasto pulmonar (MRC-5 *) depois de 4 dias de crescimento na presença de Compostos G e Composto D. Citotoxicidade foi medida usando ensaio de MTS.

[0069] A FIG. 11 é um gráfico mostrando o efeito anti-inflamatório relativo de três polissacarídeos modificados incluindo composto G da presente invenção, em secreção de TNF-alfa por células de PBMC enfatizadas com endotoxina microbiana (50 ng/mL).

[0070] A FIG. 12 é uma comparação de Composto G da presente invenção e Composto H na secreção de TNF-alfa por células de PBMC enfatizadas com endotoxina microbiana (50 ng/mL).

[0071] A FIG. 13 é uma fotografia de imunomanchamento de galectina-3 com MAb-HRP descrevendo o efeito de supressão anti-galectina do Composto G em secreção de galectina-3 por células de LX-2.

[0072] A FIG. 14 é uma representação de um modelo de fibrose de rato experimental induzida por injeção de tioacetamida (modelo TAA modelam, um modelo de fibrose hepática de toxicidade química).

[0073] A FIG. 15 é uma representação fotográfica de regressão histológica de fibrose (manchamento vermelho Sírius para colágeno) depois de tratamentos de 4 semanas com Composto G de fibrose hepática induzida por TAA.

[0074] A FIG. 16 é uma comparação gráfica e estatística de percentagem de colágeno no fígado (como uma medida de fibrose) no modelo de TAA depois de 4 semanas de tratamento com controle de veículo, Composto D e Composto G. Manchamento Vermelho Sírius foi usado para medida quantitativa de colágeno percentual nas lâminas histológicas.

[0075] A FIG. 17 é uma representação do modelo de fibrose de esteatose hepática de camundongo, um modelo experimental de NASH associado com distúrbio metabólico (diabetes severa) e dieta hiperlipídica. Da mesma forma mostrado é o desígnio experimental de tratamento com Composto G e Composto D.

[0076] A FIG. 18 é um gráfico mostrando a mudança em peso corporal de camundongos de NASH tratados com veículo, Composto D, ou Composto G.

[0077] As Figuras 19A-B mostram o significado estatístico da extensão de descrever a extensão de esteatose de célula hepática, degeneração em balão, e inflamação lobular (como resumido em uma contagem de atividade de NAFLD) em camundongos tratados com veículo, Composto D, e Composto G.

[0078] As Figuras 20A-B mostram o significado estatístico da extensão de colágeno percentual em seções hepática como medido pelo método de manchanento Vermelho Sírius, para camundongos NASH tratados com veículo, Composto D, e Composto G.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0079] Modalidades detalhadas da presente invenção são descritas aqui; entretanto, será entendido que as modalidades descritas são meramente ilustrativas da invenção que podem ser incorporadas de várias formas. Além disso, cada um dos exemplos determinados com relação às várias modalidades da invenção é pretendido ser ilustrativo, e não restritivo. Além disso, as figuras não são necessariamente em escala, algumas características podem ser exageradas para mostrar detalhes de componentes particulares. Além disso, quaisquer medidas, especificações e similar mostradas nas figuras são pretendidas ser ilustrativas, e não restritivas. Portanto, detalhes estruturais e funcionais específicos descritos aqui não serão interpretados como limitantes, porém somente como uma base representativa para ensinar alguém versado na técnica para variadamente empregar a presente invenção.

[0080] Citação de documentos aqui não é pretendida como uma admissão que quaisquer dos documentos citados aqui é técnica anterior pertinente, ou uma admissão que os documentos citados são materiais considerados à patentabilidade das reivindicações do presente pedido.

[0081] A menos que de outra maneira especificado, todas as porcentagens expressas aqui são peso/peso.

[0082] Pectinas são compreendidas de polímeros de carboidrato grandes diversificados que são compostos de uma cadeia principal de ácido galacturônico polimérico com moléculas de ramnose intercaladas periódicas e cadeias ramificadas periódicas de vários carboidratos incluindo galactose, arabinose, fucose, glicose, e outros. As moléculas de ácido galacturônico são naturalmente modificadas por metoxilação em uma porcentagem alta dos resíduos.

[0083] Os polímeros de carboidrato de pectina grandes foram es-

tudados em sua forma nativa (diretamente depois da extração de plantas) e depois de vários graus de modificação que hidrolizam e quimicamente modificam os polímeros. Enquanto pectinas modificadas são amplamente usadas na indústria de alimento para sua capacidade em gel e fornecer consistência em várias preparações de alimento, os mesmos foram da mesma forma avaliados como compostos medicinais potenciais.

[0084] Materiais de pectina derivados de planta, igualmente inalterados e modificados, foram extensivamente avaliados quando administrados oralmente a animais e seres humanos. Uma variedade de efeitos de pectinas oralmente administradas inalteradas e modificadas foram descritas incluindo saciedade aumentada, perda de peso, modificação de motilidade de intestino, e efeitos em função de intestino incluindo efeitos salutares em constipação e diarréia. Material de pectina ingerido não é digerido por enzimas do intestino normais nem absorvido pelo intestino. Portanto, há pouca a nenhuma pectina que é absorvida na corrente sanguínea depois da absorção oral.

[0085] Para avaliar o efeito de pectinas e moléculas de pectina modificadas na circulação sistêmica e órgãos de animais e seres humanos, tentativas foram feitas para desenvolver pectinas modificadas que poderiam ser utilizadas como compostos parenterais. Pectina derivada de uma mistura de fruta cítrica foi avaliada em modelos de cultura de célula e em modelos de animal de doença, particular em células de câncer e modelos de câncer em animais. O uso de pectina cítrica modificada foi mostrado causar citotoxicidade e apoptose em linhagens de célula animal. Tal pectina cítrica modificada foi proposta ser útil em condições malignas (Vide US 8,128,966).

Galectinas

[0086] Galectinas (da mesma forma conhecidas como galaptinas ou S-lectina) é uma família de lectinas que liga beta-galactosídeo. Ga-

lectina como nome geral foi proposta em 1994 para uma família de lectinas animal (Barondes, S.H., e outro: Galectinas: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76, 597-598, 1994). A família é definida por ter pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidrato característico (CRD) com uma afinidade para beta-galactosídeos e compartilhando certos elementos de sequência. Dentro da mesma cadeia de peptídeo, algumas galectinas têm um CRD com apenas alguns aminoácidos adicionais, visto que outros têm dois CRDs ligados por um peptídeo de ligação, e uma (galectina-3) tem um CRD ligado a um tipo diferente de domínio. O domínio de reconhecimento de carboidrato de galectina (CRD) é um beta-sanduíche de cerca de 135 aminoácidos. As duas folhas são ligeiramente curvadas com 6 filamentos formando o lado côncavo e 5 filamentos formando o lado convexo. Os lados côncavos formam um encaixe em que carboidrato é ligado (Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F (2004). "Introduction to galectins." *Glycoconj. J.* 19 (7-9): 433–40).

[0087] Uma ampla variedade de fenômenos biológicos foi mostrada estar relacionada a galectinas, por exemplo, desenvolvimento, diferenciação, morfogénesis, metástase de tumor, apoptose, entaçamento de RNA, etc. Entretanto, relativamente pouco é conhecido a cerca do mecanismo pelo qual galectinas exercem estas funções, particularmente em termos de reconhecimento de carboidrato.

[0088] Geralmente, o domínio de carboidrato liga-se a resíduos de galactose associados com glicoproteínas. Pelo menos quinze proteínas de galectina de mamífero foram identificadas ter um ou dois domínio de carboidrato em tandem.

[0089] Proteínas de galectina são encontradas no espaço intracelular onde os mesmos foram nomeadas várias funções e são segregadas no espaço extracelular. No espaço extracelular, proteínas de galectina podem ter funções incluindo promover interações múltiplas en-

tre glicoproteínas que pode levar a função reduzida, ou funções aumentadas, ou no caso de receptores de glicoproteína de membrana integral, modificação de sinalização celular (Sato e outro “Galectins as danger signals in host-pathogen and host-tumor interaction: new members of the growing group of “Alarmins.” In “Galectins,” (Klyosov, e outro eds), John Wiley e Sons, 115-145, 2008, Liu e outro “Galectins in acute and chronic inflammation,” Ann. N. Y. Acad. Sci. 1253: 80-91, 2012). Proteínas de galectina no espaço extracelular podem adicionalmente promover interações de célula-célula e matriz de célula (Wang e outro, “Nuclear and cytoplasmic localization of galectin-1 and galectin-3 and their roles in pre-mRNA splicing.” In “Galectins” (Klyosov et al eds.), John Wiley and Sons, 87-95, 2008).

[0090] Galectinas foram mostradas para ter domínios que promovem homodimerização. Desse modo, galectinas são capazes de ação como um “cola molecular” de tipos entre glicoproteínas. Galectinas são encontradas em compartimentos celulares múltiplos, incluindo o núcleo e citoplasma, e são segregadas no espaço extracelular onde elas interagem com superfície celular e glicoproteínas de matriz extracelular. O mecanismo de interações moleculares pode depender da localização. Enquanto galectinas podem interagir com glicoproteínas no espaço extracelular, as interações da galectina com outras proteínas no espaço intracelular geralmente ocorrem por domínios de proteína. No espaço extracelular a associação de receptores de superfície de célula pode aumentar ou diminuir sinalização de receptor ou a capacidade de interagir com ligantes. Proteínas de galectina notadamente aumentada em vários estados de doença de animal e seres humanos, incluindo, porém, não limitado a doenças associadas com inflamação, fibrose, autoimunidade, e neoplasia. Galectinas foram diretamente implicadas na patogênese de doença, como descrito abaixo. Por exemplo, estados de doenças que podem ser dependentes em galectinas

incluem, porém não são limitadas a, inflamação aguda e crônica, distúrbios alérgicos, asma, dermatite, doença autoimune, artrite inflamatória e degenerativa, doença neurológica mediada imune, fibrose de órgãos múltiplos (incluindo, porém, não limitado a fígado, pulmão, rim, pâncreas, e coração), doença inflamatória intestinal, atherosclerose, insuficiência cardíaca, doença inflamatória ocular, uma variedade grande de cânceres.

[0091] Além de estados de doença, galectinas são moléculas reguladoras importantes na modulação da resposta de células imunes para vacinação, patógenos exógenos e células de câncer.

[0092] Alguém versado na técnica apreciará que compostos que podem ligar-se a galectinas e/ou alter a afinidade de galectina por glicoproteínas, reduz interações hetero- ou homo-típicas entre galectinas, ou de outra maneira alterar a função, síntese, ou metabolismo de proteínas de galectina pode ter efeitos terapêuticos importantes em doenças dependentes de galectina.

[0093] Galectinas mostram uma afinidade por resíduos de galactose ligados a outros compostos orgânicos, tal como em lactose [(β -D-Galactosido)-D-glicose], N-acetil-lactosamina, poli-N-acetillactosamina, galactomananos, fragmentos de pectinas, bem como outra galactose contendo compostos. Deveria ser notado que galactose por si só não liga-se a galectinas, ou liga-se tão fracamente que a ligação quase não pode ser detectada.

[0094] Pectina e pectina modificada foi mostrada ligar-se a proteínas de galectina presumivelmente na base de conter resíduos de galactose que são apresentados no contexto de uma macromolécula, neste caso um carboidrato complexo em vez de uma glicoproteína no caso de células animais.

[0095] Proteínas de galectina foram mostradas ser notadamente aumentadas em inflamação, distúrbios fibróticos, e neoplasia (Ito e

outro “Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment”, Cancer Metastasis Rev. PMID: 22706847 (2012), Nangia-Makker e outro Galectin-3 binding and metastasis,” Methods Mol Biol. 878: 251-266, 2012, Canesin e outro Galectin-3 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome,” Tumour Biol. 31: 277-285, 2010, Wanninger e outro “Systemic and hepatic vein galectin-3 are increased in patients with alcoholic liver cirrhosis and negatively correlate with liver function,” Cytokine. 55: 435-40, 2011. Além disso, experiências mostraram que galectinas, particularmente galectina-1 e galectina-3, estão diretamente envolvidas na patogênese destas classes de doença (Toussaint e outro, “Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion.”, Mol Cancer. 11:32, 2012, Liu et al 2012, Newlaczyl e outro, “Galectin-3 – a jack-of-all-trades in cancer,” Cancer Lett. 313: 123-128, 2011, Banh e outro, “Tumor galectin-1 mediates tumor growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis,” Cancer Res. 71: 4423-31, 2011, Lefranc e outro, “Galectin-1 mediated biochemical controls of melanoma and glioma aggressive behavior,” World J. Biol. Chem. 2: 193-201, 2011, Forsman e outro, “Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis,” Arthritis Reum. 63: 445-454, 2011, de Boer e outro, “Galectin-3 in cardiac remodeling and heart failure,” Curr. Heart Fail. Rep. 7, 1-8, 2010, Ueland e outro, “Galectin-3 in heart failure: high levels are associated with all-cause mortality,” Int J Cardiol. 150: 361-364, 2011, Ohshima e outro, “Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis,” Arthritis Rheum. 48: 2788-2795, 2003).

[0096] Portanto, há uma necessidade para identificar terapêuticos que afetaram galectinas envolvidas em distúrbios humanos, tais como doenças inflamatórias, doenças fibróticas, doenças neoplásicas ou combinações dos mesmos, e que têm um perfil de segurança seguro,

para ser usado em terapêuticos.

Pectinas Quimicamente Modificadas e Composições

[0097] Composições compreendendo uma pectina quimicamente modificada derivadas de pectina de maçã e métodos de fabricar tal pectina de maçã modificada tendo uma atividade em um ensaio celular de fibrose inflamatória foram previamente descritas [vide US 8,236,780, incorporado aqui por referência em sua totalidade]. Tal pectina modificada foi mostrada reduzir a indução de células fibrogênicas derivadas hepática enquanto não tendo efeito em viabilidade das células.

[0098] Aspectos da invenção se referem a uma pectina quimicamente modificada ou composição de pectina modificada e métodos de produzir uma pectina modificada ou composição de pectina modificada tendo efeitos antifibrogênicos e/ou anti-inflamatórios. Em algumas modalidades, a pectina modificada é um polissacarídeo quimicamente definido como galactoarabino-ramnogalacturonato.

[0099] Composições para administração parenteral ou enteral a um indivíduo são descritas aqui. Em algumas modalidades, a composição pode compreender um derivado de pectina ou composto de pectina modificado da invenção em um veículo farmacêutico aceitável. O termo "veículo farmaceuticamente aceitável" se refere a um veículo ou adjuvante que pode ser administrado a um indivíduo (por exemplo, um paciente), juntamente com um composto desta invenção, e que não destrói a atividade farmacológica do mesmo e é não tóxico quando administrado em doses suficientes para liberar uma quantidade terapêutica ou um monte eficaz do composto.

[00100] "Veículo farmaceuticamente aceitável" se refere a qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, por exemplo, albumina humana ou polipeptídeos de gelatina reticulados, revestimentos, compostos antibacterianos e antifúngicos, isotônico, por exemplo, cloreto de sódio ou glutamato de sódio, e compostos de atraso de absorção, e

similar que são fisiologicamente compatíveis. O uso de tais meios e compostos para substâncias farmaceuticamente ativas são bem conhecidas na técnica. Preferivelmente, o veículo é adequado para administração oral, intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidural (por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da rotina de administração, o composto ativo pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

[00101] Em algumas modalidades, o composto de pectina modificado é obtido a partir de uma pectina de grau farmacêutico.

[00102] Em algumas modalidades, a pectina modificada da presente invenção pode ter efeitos anti-inflamatório realçados e/ou antifibrogênicos realçados quando comparado a composições de pectina pré-vias. Em várias modalidades, a pectina modificada da presente invenção pode inibir secreção de fator de necrose de Tumor (TNF- α , caquexina), uma proteína envolvida em inflamação sistêmica e um membro principal de um grupo de citocinas que estimula a reação de fase aguda. É produzido principalmente por macrófagos ativados. Em várias modalidades, a pectina modificada da presente invenção não causa citotoxicidade. Em várias modalidades, a pectina modificada ou composição de pectina modificada tem propriedades anti-inflamatórias potentes e antifibrose sem exibir citotoxicidade. Isto representa uma nova e inesperada combinação de efeitos que sugerem que a pectina modificada de grau farmacêutico pode ter efeitos importantes no tratamento de doenças inflamatórias humanas, doenças fibróticas, distúrbios neoplásicos ou combinações dos mesmos.

[00103] Em um aspecto, métodos para tratar (por exemplo, controlar, aliviar, melhorar, aliviar, ou reduzir a progressão de) ou métodos por prevenir (por exemplo, atrasar o início de ou reduzir o risco de desenvolver) uma ou mais doenças, distúrbios, ou condições em que ga-

lectinas estão envolvidas, em um indivíduo em necessidade dos mesmos são caracterizado. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um composto da invenção, ou uma composição compreendendo o composto da invenção, ao indivíduo.

[00104] Quando aqui usado, o termo "dose eficaz" se refere à quantidade de um composto que, sozinho ou em combinação com uma quantidade de um agente terapêutico, quando administrado como uma formulação parental, subcutânea, inalada, intra-articular, ocular, ou oral ou a um animal ou humano com uma doença inflamatória dependente de galectina, fibrótica ou neoplásica resulta em redução em atividade de doença, como definido abaixo em várias modalidades.

[00105] "Administração" se refere a oral, ou parenteral incluindo intravenosa, subcutânea, tópica, transdérmica, intradérmica, transmucosal, intraperitoneal, intramuscular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intraespinhal, injeção epidural e intrasternal e infusão.

[00106] Em algumas modalidades, o composto de galactoarabino-ramnogalacturonato tem resíduos de galactose terminais que podem constituir a entidade de ligação principal em proteínas de galectina. A composição de cadeia lateral restante pode estabilizar ou realçar sua interação com proteínas de galectina e desse modo potencializar a ação terapêutica do composto. Intereração com galectinas pode não ser o único mecanismo pelo qual Composto G exerce sua ação terapêutica. Enquanto não desejando ser ligado por especulação, o composto de galactoarabino-ramnogalacturonato ramificado da invenção pode interagir com proteínas de galectina e pode ter efeitos terapêuticos amplos que não foram vistos com galactose ou derivados de moléculas pequenas de galactose.

[00107] Em algumas modalidades, o composto da presente inven-

ção é um polissacarídeo quimicamente definido como galactoarabino-ramnogalacturonato (da mesma forma referido aqui como “Composto G”), um heteropolímero ramificado tendo uma cadeia principal caracterizada como moléculas de ácido galacturônico 1,4-ligado de maioria homopoly (GalA) e resíduos de galacturonato de metila (MeGalA) com regiões curtas intermitentes de alternando ramnose α-1,4-ligada GalA e α -1,2-ligado (Rha), visto que as unidades de Rha são também ligadas a cadeias laterais. Estas cadeias laterais consistem predominantemente em resíduos de 1,4- β -D-galactose (Gal) e/ou resíduos de 1,5- α -L-arabinose (Ara). Outros carboidrato podem estar presentes em quantidade pequena nas cadeias laterais de Gal e Ara tal como resíduos de L-xilose (Xyl), D-glicose (Glu) e L-fucose (Fuc). Quando aqui usado, o termo "cadeia principal" se refere à cadeia principal de um polissacarídeo, ou a cadeia originando da cadeia principal de um polissacarídeo de partida, tendo porções de sacarídeo sequencialmente ligadas por ligações alfa ou beta glicosídicas. Uma cadeia principal pode compreender porções de monossacarídeo adicionais conectadas a isso em várias posições ao longo da cadeia sequencial.

[00108] Em algumas modalidades, Composto G é um heteropolímero ramificado natural modificado quimicamente controlado de polissacarídeos de planta, alguns dos quais estão comercialmente disponíveis como material de pectina de USP. Estes materiais de pectina naturais são de peso molecular médio alto variando de 40.000 a mais de 1.000.000 Dalton (D) e são misturas cruas. Pectinas de USP mais comuns são de fruta cítrica, maçã e beterrabas, embora outros estão da mesma forma disponíveis.

[00109] Em algumas modalidades, a composição de Composto G pode ter um uma faixa de peso molecular médio de 2.000 a 80.000 D. Em algumas modalidades, o peso molecular médio do composto G pode variar de 20.000 a 70.000 D. Em exemplos específicos, o galactoarabino-

ramnogalacturonato pode ter um peso molecular médio de 5.000 a 55.000 D. Tais compostos de galactoarabino-ramnogalacturonato podem ser obtidos preferivelmente através de tratamentos químicos e físicos e purificação de substância pectica natural de pectina de maçã. Entretanto compostos similares a Composto G podem ser obtidos de pectina cítrica, beterraba e outras plantas sob extração apropriada e processamento químico.

[00110] Em uma modalidade, o galactoarabino-ramnogalacturonato seletivamente despolimerizado (Composto G), um heteropolímero ramificado, pode ter um peso molecular médio de 2.000 a 80.000, ou 20.000 a 70.000, ou 5.000 a 55.000 Daltons, como determinado por método de SEC-RI e MALLS. Quando aqui usado, o termo "despolimerização" se refere a hidrólise parcial, seletiva ou completa da cadeia principal de polissacarídeo ocorrendo, por exemplo, quando o polissacarídeo é quimicamente tratado resultando em fragmentos de tamanho reduzido quando comparado com o polissacarídeo original.

Métodos para produzir Composto G

[00111] Aspectos da invenção se referem a métodos para produzir galactoarabino-ramnogalacturonato seletivamente despolimerizado. Em algumas modalidades, o processo da presente invenção inclui métodos pretendidos preservar a estrutura e/ou características de beta galactose e capacidades de ligação de galactose das cadeias laterais compreendidas principalmente em galactose e arabinose, e realçar a prevalência de porções de ligação de galactose no composto de galactoarabino-ramnogalacturonato. Em algumas modalidades, os métodos podem gerar um composto de galactoarabino-ramnogalacturonato tendo um peso molecular médio reduzido, para ser compatível com formulações terapêuticas para administração pluralista por meio de rotinas, incluindo, porém, não limitada a intravenosa, subcutânea, inalada, intra-articular, ocular, e oral.

[00112] Em algumas modalidades, o composto pode ser sintetizado a partir de pectina de USP natural, altamente ramificada, minimamente processada e metoxilada alta que pode vir de qualquer fonte de planta, incluindo, porém, não limitada a frutas cítricas, maçã, ou beterraba.

[00113] Em algumas modalidades, o composto pode ser sintetizado a partir de pectina de USP natural, altamente ramificada, minimamente processada e metoxilada alta como uma fabricada a partir bagaço de maçã contendo 8-12% de pectina.

[00114] Em algumas modalidades, o composto pode ser sintetizado sob uma hidrólise suficientemente controlada e específica do GalA α -1,4-ligado metoxilado ligado glicosídico preservando as cadeias laterais com quantidades enriquecidas de 1,4- β -D-Gal e 1,5- α -L-Ara. Quantidades de 1,4- β -D-Gal e 1,5- α -L-Ara podem ser quantitativamente determinadas por métodos de GC-MS (cromatografia de Gás-espectroscopia de massa) e AELC-PAD (cromatografia líquida de troca iônica-detector amperométrico pulsado).

[00115] Em algumas modalidades, o composto pode ser produzido por um processo compreendendo despolimerização catabolizada por clivagem de peroxidação alvejada de ligações glicosídicas (da mesma forma conhecido como reação de eliminação beta) por OH^{sup+} ionizado gerado a partir de ácido ascórbico e/ou peróxido na presença de uma forma reduzida de um íon de metal de transição, como Cu^{sup.++} a 1 a 100 mM. Outros metais de transição como Ca.^{sup.++} ou Fe.^{sup.++} podem da mesma forma ser usados para este propósito.

[00116] Em algumas modalidades, compostos despolimerizados podem ser expostos a faixa de pH de 8 a 10 durante 10 a 30 minutos em temperatura de 2 a 60°C para iniciar desmetoxilação parcial controlada para gerar um composto despolimerizado seletivamente mediano com um grau de metoxilação de 40 a 70 por cento em comparação a níveis iniciais de cerca de 87%. O composto resultante pode ser

referido como composto metoxilado mediano. Metoxilação completa de ácido galacturônico é considerada ser aproximadamente DE 87%.

[00117] Em algumas modalidades, o polissacarídeo seletivamente despolimerizado da presente invenção pode ter um nível de endotoxina de não mais do que 100 EU ou não mais do que 300 EU como avaliado por método de LAL.

[00118] Em algumas modalidades, o polissacarídeo seletivamente despolimerizado da presente invenção pode ter não mais do que 0,05% de impurezas nitrogenosas, como avaliado por nitrogênio total.

[00119] Em algumas modalidades, a composição despolimerizada pode ser exposta a lavagens múltiplas de álcool ácido quente (30-80°C) para remover qualquer endotoxina residual, cobre e metais pesados, contaminantes agrícolas e outras impurezas.

Usos

[00120] Em algumas modalidades, a atividade terapêutica do composto da invenção pode ser derivada de beta-galactose múltipla e porções de arabinose presentes no composto. Tais porções podem imitar glicoproteínas celulares em superfícies de célula e a matriz extracelular que liga-se a proteínas de galectina (por exemplo proteínas de ligação de galactose) que são altamente expressas em processos inflamatórios, fibrogênicos, e processos tumorgênicos. A expressão de galectina-3 foi provada ser crítica a inflamação e fibrogênese em órgãos múltiplos, incluindo porém não foi limitado a fígado, rim, coração, e pulmão. Modulando sua atividade podem desse modo levar a inibição e reversão de processos patológicos.

[00121] Em outra modalidade, o polissacarídeo seletivamente despolimerizado da presente invenção não tem citotoxicidade e não induz apoptose em sistemas de cultura de célula. Como tal, o polissacarídeo seletivamente despolimerizado da presente invenção difere-se de outras preparações conhecidas de pectinas modificadas que foram rela-

tadas (Vide US 8,128,966).

[00122] Em outra modalidade, o polissacarídeo seletivamente despolimerizado da presente invenção pode ter um efeito anti-inflamatório em células mononucleares de sangue periférico (PMBC) e outras linhagens celulares inflamatórias. Por exemplo, Composto G pode reduzir expressão ou resposta a indutores de genes de citocina ou proteínas, incluindo, porém, não limitado a TNF-alfa. O processo de inflamação e reparo pode envolver tipos de célula múltiplas incluindo células do sistema imune e muitos mediadores inflamatórios em um complexo e cascata interconectada de eventos. Inflamação aguda pode ser terminada ou pode progredir a uma fase crônica que pode levar a fibrose, um estágio recente de dano visto em uma variedade de doença de órgão humano incluindo, porém, não limitado a fígado, pulmão, rim, coração e pâncreas.

[00123] Inflamação crônica em órgãos frequentemente leva a um acúmulo de tecido fibrótico. De fato, o resultado final de inflamação de etiologias subjacentes múltiplas é geralmente fibrose e disfunção de órgão resultante. Isto é evidente em, por exemplo, pulmão, coração, rim, pâncreas, e fígado. Linhagens múltiplas de ponto de evidência para proteínas de galectina, e galectina-3 em particular, como fatores críticos na patogênese de fibrose de órgão. Por exemplo, foi mostrado que Galectina-3 suprime camundongos nulos são resistentes a fibrose hepática com respeito a hepatotoxinas, resistentes a fibrose pulmonar com respeito a bleomicina intra-traqueana, e pode ser usada como modelos de fibrose de rim, fibrose de coração, e pancreatite crônica (Henderson e outro, "The regulation of inflammation by galectin-3," Immunol Rev. 230: 160-171, 2009, Iacobini e outro, "Galectin-3 ablation protects mice from diet-induced NASH: a major scavenging role for galectin-3 in liver," J. Hepatol. 54: 975-983, 2011, Lopez e outro, "Gene expression profiling in lungs of chronic asthmatic mice treated

with galectin-3: downregulation of inflammatory and regulatory genes," Mediators Inflamm., 823279. Epub 2011, Kolatsi-Joannou e outro, "Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury," PLoS One. 6(4): e18683, 2011).

[00124] "Fibrose" se refere a qualquer distúrbio de tecido, incluindo, porém, não limitado a tais distúrbios celulares como, por exemplo, cirrose, fibrose de rim, fibrose hepática, fibrose ovariana, fibrose pulmonar, fibrose gastrointestinal ou de estômago, e miomas. O termo "fibrose" se refere igualmente a processo patológico que conduz lesão de tecido através de sua encapsulação por matriz extracelular, e o resultado do processo que é uma formação patológica de tecido de cicatriz.

[00125] "Cirrose" se refere a qualquer distúrbio de tecido, incluindo tais distúrbios celulares incluindo, porém, não limitado a cirrose renal, cirrose hepática, cirrose ovariana, cirrose pulmonar, cirrose gastrointestinal ou do estômago. O termo "cirrose" se refere a um estágio avançado de fibrose, definido pela presença de nódulos encapsulados. Para propósitos desta especificação e reivindicações, "cirrose" é considerada ser um tipo de fibrose, e é incluída dentro do significado do termo "fibrose" usado aqui.

[00126] Quando aqui usado, "marcadores moleculares", "marcadores bioquímicos", "biomarcadores", ou "marcadores" são usados alternadamente e se referem a moléculas individuais de origem biológica, que podem ser monitorados como uma "leitura" de eventos metabólicos específicos. Estes eventos são acompanhados por formação dos "marcadores", o nível quantitativo do qual pode ser frequentemente usado como uma indicação a avanço do evento.

[00127] Lesão que conduz a fibrose no fígado pode ocorrer com respeito a uma variedade de insultos crônicos, incluindo, porém, não limitado a abuso de álcool, fármacos, toxinas, acúmulo de gordura,

hepatite viral B e C, algumas doenças metabólicas causando irritação de tecido crônica e/ou permanente que levando a inflamação e acúmulo de colágeno, ou fibrose.

[00128] O estágio avançado de fibrose hepática é cirrose, definida pela presença de nódulos hepatocelulares encapsulados por faixas largas de tecido fibroso. Fibrose é uma resposta sistemática e coordenada a lesão crônica, desenvolvendo através de uma série de eventos moleculares altamente coordenados, fibrogênese coletivamente denominada. Por exemplo, fibrose pode desenvolver como um resultado de lesão hepática de mamífero crônica. As etapas imediatamente seguindo lesão hepática crônica podem resultar na ativação de células estreladas hepáticas. A ativação de células estreladas pode levar a proliferação, fibrogênese e cirrose. Os eventos de ativação em células estreladas podem ser identificados por marcadores moleculares específicos, tais como colágeno I, actina de músculo liso alfa 1, receptor de beta PDGF (um biomarcador de proliferação), metaloproteinases de matriz e seus inibidores MMP2, MMP9, TIMP1 e TMP2 (marcadores em degradação de matriz), e uma variedade de citocinas, incluindo, porém, não limitado a TFG-beta1 (um marcador de fibrogênese). Desenvolvimento de fibrose pode ser avaliada pelo nível quantitativo dos marcadores respectivos. Redução de fibrose pode ser avaliada pela diminuição do nível dos marcadores respectivos durante vários estágios de fibrose.

[00129] O espectro patofisiológico de fibrose pode estar associado com biomarcadores de soro incluindo, porém, não limitado a ácido hialurônico e outros produtos de ruptura de colágenos, citoqueratina-18 e outras proteínas de célula citoesquelética, inibidor de tecido de metaloprotease I e II, outro colágeno derivado hepática, proteases de matriz ou combinações dos mesmos. Este compõe e/ou biomarcadores podem ser medidos em soro ou tecido hepática usando

imunoensaios e os níveis correlatados com severidade de doença e tratamento.

[00130] O espectro patofisiológico de fibrose da mesma forma pode estar associado com biomarcadores de soro, incluindo, porém, não limitado a produtos de oxigênio reativos de lipídio ou de origem de proteína, moléculas de lipídio ou conjugados, ou combinações dos mesmos. Estes biomarcadores podem ser medidos por vários meios incluindo imunoensaios e eletroforese e seus níveis correlatados com severidade de doença e tratamento. Biomarcadores adicionais podem incluir trocas globais em análise proteômica de soro ou proteínas de urina.

[00131] O espectro patofisiológico de fibrose da mesma forma pode estar associado com biomarcadores de soro de NASH, um distúrbio inflamatório metabólico crônico que leva a fibrose e é descrito neste pedido. Estes biomarcadores podem ser citocinas, incluindo, porém, não limitado a TNF-alfa, TGF-beta ou IL-8, ou um perfil metabólico de componentes de soro que são indicativos de presença de NASH ou severidade (estes incluem soro e marcadores de urina) ou combinações dos mesmos. Um perfil de um ou mais dos biomarcadores de citocinas, como medido por imunoensaio ou avaliação proteômica por espectrometria de massa LC, pode fornecer uma avaliação de atividade da doença e um marcador para seguir em terapia da doença.

[00132] O espectro patofisiológico de fibrose no fígado da mesma forma pode estar associado com resultados histopatológicos em biópsia hepática, que inclui porém não são limitados a, evidência de acúmulo de colágeno (incluindo, porém, não limitado a acúmulo de colágeno peri-senoidal, portal, central ou combinações dos mesmos), acúmulo de colágeno em ponte portal a central, nódulos hepatocelulares que torcem a arquitetura normal, atipia hepatocelular consistente com transformação maligna ou combinações dos mesmos.

[00133] O espectro patofisiológico de fibrose no fígado da mesma

forma pode estar associado com outros resultados histológicos patológicos em biópsia hepática que estão associados com a causa subjacente de doença hepática crônica que resulta em fibrose. Tais resultados podem incluir, porém são limitados a, anormalidades em hepatócitos (incluindo, porém, não limitadas a degeneração em balão e hialina intracelular e gordura macrovesicular ou microvesicular ou combinações dos mesmos), células endoteliais, macrófagos, ou células do canal de bálsis e a infiltração de tipos múltiplos de células inflamatórias, tal como linfócitos, monócitos, e/ou neutrófilos, ou qualquer combinação do anterior.

[00134] O espectro patofisiológico de fibrose pode da mesma forma incluir resultados histopatológicos em biópsia hepática que está relacionada à doença subjacente de NASH. Tais resultados podem incluir, porém não são limitados a, evidência de gordura intra-hepatocelular, toxicidade hepatocelular incluindo, porém, não limitada a corpos de hialina, infiltrados de célula inflamatória (incluindo, porém, não limitado a linfócitos e vários subconjuntos de linfócitos e neutrófilos), mudanças em células do canal de bálsis, mudanças em células endoteliais, número de macrófagos de célula de Kupffer, acúmulo de colágeno (incluindo, porém, não limitado a acúmulo de colágeno peri-senoidal, portal e central e acúmulo de colágeno em ponte portal a central, nódulos hepatocelulares que torcem a arquitetura normal, atipia hepatocelular consistente com transformação maligna, e várias escalas e métodos que combinam vários grupos de observações para classificar a severidade de NASH ou quaisquer combinações do anterior. Tais avaliações histológicas podem ser o sine-qua-nona de diagnóstico de NASH e portanto pode integralmente relacionar a avaliação de terapia.

[00135] O espectro patofisiológico de fibrose pode da mesma forma incluir resultados histopatológicos em biópsia hepática que examinam a expressão de ou mudam em expressão de várias moléculas e sua

localização em tecido hepática ou vários tipos de célula. Moléculas adequadas incluem, porém não são limitadas a, várias proteínas de citocina. Proteínas de citocina de interesse podem incluir, porém não são limitadas a, TGF-beta, mediadores inflamatórios, proteínas de transporte de recuperador de metabólito reactivo, incluindo porém não limitadas a, CD36, e proteínas de galectina, incluindo, porém, não limitada a proteína de galectina-3, ou qualquer combinação do anterior.

[00136] Manifestações clínicas de fibrose podem incluir, porém não são limitadas a, teste clínico de estágio e severidade da doença, sinais clínicos e sintomas de doença, e/ou complicações médicas resultando em fibrose. Teste clínico de estágio e severidade de fibrose hepática pode incluir, porém não é limitado a, teste hematológico (incluindo, porém, não limitado a contagem de eritrócito e/ou morfologia, contagem de leucócito e/ou diferencial e/ou morfologia, e/ou contagem de placa e morfologia), soro ou lipídios de plasma, incluindo, porém, não limitado a triglicerídeos, colesterol, ácidos graxos, espécies de lipoproteína e espécies de peroxidação de lipídio, soro ou enzimas de plasma (incluindo, porém, não limitado a aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (AP), gama glutamil-transpeptidase (GGTP), lactato desidrogenase (LDH) e isoformas, albumina de soro ou plasma e outras proteínas indicativas da capacidade sintética hepática, níveis de soro ou plasma de bilirrubina ou outros compostos indicativos da capacidade hepática clarear subprodutos metabólicos, soro ou eletrólitos de plasma (incluindo, porém, não limitado a sódio, potássio, cloreto, cálcio, fósforo), perfil de coagulação incluindo, porém, não limitado a tempo de protrombina (PT), tempo de tromoplastina parcial (PTT), níveis de fator de coagulação específicos, tempo de hemorragia e função de plaqueta. Teste clínico da mesma forma inclui porém não é limitado a teste não-invasivo e invasivo que avalia a arquitetura, integridade estrutural ou função hepática incluin-

do, porém, não limitado a tomografia computadorizada (varredura de CT), ultra-som (US), elastografia ultra-sônica (FibroScan) ou outras medidas da elasticidade de tecido hepática, varredura ou espectroscopia de ressonância magnética, elastografia de ressonância magnética, agulha percutânea ou cutânea ou biópsia hepática transjugular e avaliação histológica (incluindo, porém, não limitada a manchamento para componentes diferentes usando tinturas de afinidade ou imuno-histoquímica), medida de gradiente de pressão de cunha portal-venoso hepático, ou outros testes não invasivos ou invasivos que podem ser desenvolvidos para avaliar severidade da fibrose no tecido hepática ou qualquer combinação do anterior.

[00137] Sinais clínicos e sintomas de fibrose avançada que progrediu para cirrose podem incluir fadiga, perda de peso muscular, angiomata aracneiforme, dor abdominal, inchaço abdominal, ascites, hemorragia gastrointestinal, outras complicações de hemorragia, contusões fáceis e equimoses, edema periférico, hepatomegalia, fígado firme nodular, sonolência, transtorno do sono, confusão, e/ou coma. Complicações médicas de fibrose estão relacionadas a cirrose e incluem ascites, edema periférico, esofágicas e outras varizes do trato gastrointestinal, hemorragia gastrointestinal, outras complicações de hemorragia, emagrecimento e emaciação muscular, síndrome hepatorrenal, e encefalopatia hepática. Uma complicação adicional de cirrose relacionada a fibrose é o desenvolvimento de complicações suficientemente severas para autorizar colocação em lista de transplante hepática ou receber um transplante hepática.

[00138] Doença epática não alcoólica (NAFLD) e esteatohepatite (NASH) são distúrbios hepáticos comuns nos Estados Unidos e Europa. Histopatologicamente, estes distúrbios se assemelham a doença epática alcoólica, porém pode ocorrer em pessoas que bebem pouco ou nenhum álcool. As mudanças patológicas no fígado incluem, porém

não são limitadas a, acúmulo de gordura em hepatócitos, evidência de degeneração hepatocelular, infiltrados de células inflamatórias, deposição em excesso tecido fibroso, formação de nódulo hepatocelular, cirrose, carcinoma hepatocelular e combinações dos mesmos.

[00139] A característica principal em NAFLD é acúmulo de gordura em hepatócitos com inflamação mínima. NAFLD é normalmente identificado na base de uma biópsia hepática realizada por causa de níveis de transaminase hepática ligeiramente elevada no soro do paciente ou a suspeita de esteatope hepática em teste não invasivo tal como tomografia computadorizada ou ultra-som.

[00140] Um subconjunto de indivíduos com NAFLD é constatado ter NASH, que é esteatose epática com a adição do desenvolvimento de infiltração de células inflamatórias (incluindo, porém, não limitado a neutrófilos ou linfócitos) dentro do lóbulo, veia central e áreas portais e evidência de dano a hepatócitos, incluindo, porém, não limitado a degeneração em balão. Este estado inflamatório de NASH pode resultar no acúmulo de tecido fibroso, incluindo, porém, não limitado a colágeno que pode levar a cirrose, formação de nódulo, e/ou carcinoma hepatocelular.

[00141] O progresso da doença é insidioso visto que a maioria das pessoas com NASH sentem-se bem e não estão atentas que os mesmos têm um problema hepática. Apesar da falta de sintomas, NASH pode ser severo e pode levar ao acúmulo de material fibrótico no fígado que pode resultar em cicatriz severa e/ou cirrose e, em alguns casos, carcinoma hepatocelular.

[00142] A causa de lesão hepática em NASH não é conhecida. Teorias múltiplas foram propostas, com alguns dados experimentais para sugerir seu envolvimento. Alguns destes incluem, porém não são limitados a, resistência de hepatócito para a ação de insulina, produção de citocinas inflamatórias por células de gordura e outras células in-

flamatórias que danificam o fígado e recrutam células inflamatórias adicionais e estresse oxidativo em hepatócitos com produção de radicais de oxigênio reativos que danificam células hepática e induzem inflamação.

[00143] Até esta data nenhuma terapia específica para NASH ou fibrose existe e apenas recomendações de saúde geral são atualmente fornecidas a pacientes. Estas incluem redução de peso, comendo uma dieta balanceada e saudável, aumentando atividade física, e evitando álcool e medicamentos desnecessários. Perda de peso pode melhorar testes hepática de soro em alguns pacientes com NASH e pode melhorar evidência de dano hepática histológico, porém não reverte doença hepática severa. Além disso, deveria ser notado que não todos os pacientes com NASH estão com sobre peso.

[00144] Uma variedade de abordagens experimentais foi avaliada, ou estão sob avaliação em pacientes com NASH ou fibrose incluindo, porém, não limitado a administração de antioxidantes, tal como vitamina E, selênio, betaina, e agentes antidiabéticos incluindo metformina, rosiglitazona, e pioglitazona. Todos os resultados clínicos até esta data têm desapontado. Em algumas modalidades, o composto da presente invenção pode ser usado no tratamento de NASH ou fibrose. O composto da presente invenção pode ser eficaz através de manipulação de proteínas de galectina que está envolvido em patogênese e progressão de doenças.

[00145] Em algumas modalidades, o composto da presente invenção (isto é composto G) tem um efeito clinicamente significante em metabolismo de esteatose hepática além de fibrose, visto que pode ter mais de um efeito clinicamente significante em patologias relacionadas além de inflamação e fibrose.

[00146] Em algumas modalidades, o composto da presente invenção tem um efeito antifibrótico em modelo de fibrose de rato onde fi-

brose é induzida por toxina química tioacetamida (TAA) que têm patologia similar ao efeito de consumo crônico de álcool que leva a fibrose, cirrose e aumenta ocorrência de hepatocarcinoma. (as Figuras 13-14)

[00147] Em algumas modalidades, o composto da presente invenção tem um efeito anti-inflamatório reduzindo secreção de TNF alfa como descrito em um modelo *in-vitro* usando célula de PBMC enfatizada com endotoxina microbiana para produzir TNF alfa, uma citocina principal, um biomarcador e uma proteína inflamatória (a FIG. 16).

[00148] Com base nessa constatação, o Composto G é proposto como terapia sozinho ou em combinação com outros compostos listados acima como tratamento para NASH humano. Em algumas modalidades, o composto da presente invenção pode ser usado para melhorar ou reverter acúmulo de gordura de hepatócito, infiltrado inflamatório intraportal e intralobular, e/ou fibrose, incluindo, porém, não limitado a acúmulo de colágeno no espaço peri-senoidal, cirrose, e para prevenir progressão para carcinoma hepatocelular.

[00149] Além de NASH, há outras doenças hepática crônicas múltiplas que resultam em fibrose e podem progredir para cirrose. Por exemplo, doenças epáticas crônicas podem incluir, porém não são limitadas a, infecção por vírus da hepatite crônica (hepatite B, C, e D), abuso de álcool crônico, doenças biliares (incluindo, porém, não limitadas a colangite esclerosante), cirrose biliar primária, doença de depósito genético, e doenças de depósito metal (incluindo, porém não limitadas a hemocromatose e doença de Wilsons).

[00150] Em algumas modalidades, Composto G pode ser eficaz em todas as doenças epáticas crônicas que levam a fibrose independente da etiologia subjacente.

[00151] Em algumas modalidades, Composto G pode ser eficaz no tratamento de fibrose em órgãos diferentes hepática, incluindo, porém, não limitado a pulmão, rim, coração e pâncreas ocorre através de in-

flamação crônica levando a acúmulo de colágeno por tipos de célula diferentes de células estreladas que são específicas ao fígado. As células responsáveis por fibrose em outros órgãos são miofibroblastos que têm células precursoras que incluem, porém não são limitadas a, fibroblastos de tecido residentes, fibrócitos circulantes, ou células epiteliais geradas através de um processo chamado transformação mesenquimal EMT—epitelial.

[00152] Fibrose pulmonar pode ocorrer como resultado de processo inflamatório crônico em uma variedade de doenças incluindo, porém, não limitada a fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica, e infecções crônicas.

[00153] Fibrose no pulmão normalmente leva a rigidez dos tecidos pulmonares resultando em função reduzida do pulmão, incluindo, porém, não limitado a capacidade pulmonar total reduzida, capacidade vital, volume expiratório forçado, e capacidade de difusão. Estas funções reduzidas podem levar a sintomas clínicos, incluindo, porém, não limitado a falta de ar, tolerância a exercício reduzida, e troca de gás reduzida resultando em baixos níveis de oxigênio do sangue. O último resultado pode ser insuficiência pulmonar que requer um transplante de pulmão. Não há qualquer terapia farmacológica atual para fibrose pulmonar.

[00154] Fibrose de rim pode ocorrer como um resultado de doenças subjacentes múltiplas, incluindo, porém, não limitada a diabetes, obstrução do trato urinário, hipertensão, doença vascular, e doenças autoimunes.

[00155] Fibrose de rim pode progredir para inibir função renal que resulta em produção de urina reduzida e a acúmulo de metabólitos tóxicos na corrente sanguínea. Insuficiência renal associada com fibrose de rim requer suporte externo através de diálise ou um transplante de rim. Não há qualquer terapia farmacológica atual conhecida para fibrose de rim.

[00156] Insuficiência cardíaca progressiva está associada com doenças múltiplas, incluindo, porém, não limitada a hipertensão crônica, doença da artéria coronária, cardiopatia valvular, e cardiopatia hipertófica. Insuficiência cardíaca pode ocorrer em parte por causa do acúmulo de tecido fibroso no músculo de coração, um processo que foi mostrado estar associado casualmente com uma expressão aumentada de galectina-3. Insuficiência cardíaca progressiva pode resultar em contratilidade reduzida cardíaca, dilatação das câmaras cardíaca, débito cardíaco reduzido com sintomas resultantes múltiplos incluindo edema, falta de ar, função renal reduzida, confusão mental, e outros. No estágio final, insuficiência cardíaca pode apenas ser tratada com dispositivos de ajuda cardíacos mecânicos ou transplante de coração.

[00157] Inflamação crônica do pâncreas devido geralmente, porém não exclusivamente, a abuso de álcool, pode resultar em fibrose do pâncreas e função reduzida do pâncreas exócrino e endócrino. Função exócrina reduzida pode levar a má absorção de alimento e função endócrina reduzida pode levar a distúrbios endócrinos, tal como diabetes. Até esta data, não há qualquer terapia farmacológica para fibrose de pâncreas.

[00158] Proteínas de galectina foram mostradas ter funções múltiplas em células de câncer incluindo, porém, não limitadas a invasividade aumentada, causando resistência a quimioterapia, promovendo metástase, aumentando neovascularização, e permitindo evasão do sistema imune.

[00159] A vasta maioria de cânceres expressam quantidades aumentadas de proteínas de galectina. Inibição de galectinas por meio de administração do composto da presente invenção (por exemplo composto G) pode ser eficaz em terapia de cânceres que expressam galectinas incluindo, porém, não limitada a cânceres de pele (escamoso e melanoma), boca, cabeça e pescoço, sistema linfático, células do

sangue, trato alimentar (esôfago, estômago, intestino delgado, cólon e reto), pâncreas, vias biliares, fígado, pulmão, mama, rim, ovário, testículos, cerviz, útero, e sistema neurológico

[00160] Aspectos da invenção se referem a um composto, ou uma composição compreendendo o composto, utilizado para o tratamento de distúrbios inflamatórios e fibróticos em que galectinas estão envolvidas na patogênese, incluindo, porém, não limitado a atividade antifibrose aumentada em órgãos, incluindo, porém, não limitado a fígado, rim, pulmão e coração. Outros aspectos da invenção se referem aos métodos de tratar distúrbios inflamatórios e fibróticos em que galectinas estão envolvidas na patogênese.

[00161] Em algumas modalidades, a invenção se refere a um composto, uma composição que tem atividade terapêutica ou um método para reduzir a patologia e atividade de doença associada com esteatohepatite não alcoólica (NASH) incluindo, porém, não limitada a esteatose (acúmulo de gordura em hepatócitos), degeneração em balão de hepatócitos, infiltrado inflamatório no fígado, e acúmulo de colágeno ou fibrose.

[00162] Em algumas modalidades, a invenção se refere a um composto, ou uma composição compreendendo o composto, utilizado no tratamento de distúrbios inflamatórios e autoimunes em que galectinas estão envolvidas na patogênese incluindo, porém, não limitado a artrite, artrite reumatóide, asma, e doença inflamatória intestinal (colites ulcerativas e Doença de Crohn).

[00163] Em algumas modalidades, a invenção se refere a um composto, ou uma composição compreendendo o composto, utilizado em tratamento de condições neoplásicas (por exemplo cânceres) em que galectinas estão envolvidas na patogênese inibindo-se processos promovidos pelo aumento em galectinas, incluindo, porém, não limitado a invasão de célula de tumor, metástase e neovascularização.

[00164] Em algumas modalidades, a invenção se refere a um composto, ou uma composição compreendendo o composto, utilizado realçando-se ou um método para realçar a capacidade de tumor infiltrar células T, que são inibidas pelo efeito de proteínas de galectina derivadas de tumor, para mais efetivamente identificar e matar células de tumor e desse modo reduzir, parar ou reverter a progressão de tumores.

[00165] Em algumas modalidades, a invenção se refere a um composto, uma composição compreendendo o composto utilizado em combinação com imunoterapia de tumor que pode ser uma vacina dirigida para抗ígenos de tumor específicos ou agentes que ativam ou inibem moléculas reguladoras imunes específicas incluindo, porém, não limitado a CTLA4, OX40, PD-1, ou PD-L.

[00166] Uma dose eficaz do composto da presente invenção ou uma composição compreendendo uma dose eficaz do composto pode ser administrada por meio de uma variedade de rotinas incluindo, parenteral por meio de uma infusão intravenosa determinada como infusões de bolo repetidas ou infusão constante, injeção intradérmica, subcutaneamente dada como injeção de bolo repetida ou infusão constante, injeção intra-articular, inalada em uma formulação apropriada, ou administração oral.

[00167] A quantidade administrada depende da formulação de composto, rotina de administração, etc. e é geralmente empiricamente determinada em tentativas rotineiras, e variações necessariamente ocorrerão dependendo do alvo, do hospedeiro, e da rotina de administração, etc.

[00168] "Administração" se refere a oral, ou parenteral incluindo intravenosa, subcutânea, tópica, transdérmica, intradérmica, transmucosal, intraperitoneal, intramuscular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnóide, intraespinhal, epidural e injeção intrasternal e infusão.

[00169] Uma dose parenteral eficaz do composto da presente invenção em um animal experimental pode estar dentro da faixa de 2 mg/kg até 200 mg/kg de peso corporal dada intravenosamente. Uma dose de injeção subcutânea eficaz do composto da presente invenção a um animal pode estar dentro da faixa de 2 mg/kg até 200 mg/kg de peso corporal, ou por intraperitoneal 2 mg/kg até 200 mg/kg ou por administração oral 10 mg/kg ou 50 mg/kg ou 200 mg/kg ou 1500 mg/kg de peso corporal. Doses mais altas e mais baixas podem da mesma forma ser contempladas.

[00170] Uma dose parenteral eficaz do composto da presente invenção a um indivíduo humano pode estar dentro da faixa de 0,2 mg/kg até 20 mg/kg de peso corporal dada intravenosamente. Uma dose de injeção subcutânea eficaz do composto da presente invenção a um indivíduo humano pode estar na faixa de 0,2 mg/kg até 50 mg/kg de peso corporal ou por administração oral 10 mg/kg até 200 mg/kg de peso corporal. Doses mais baixas e mais altas do que aquelas recitadas acima podem ser requeridas. Dosagem específica e regimes de tratamento para qualquer paciente particular dependem de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do composto específico empregado, a idade, peso corporal, estado de saúde geral, sexo, dieta, tempo de administração, taxa de excreção, combinação de fármaco, a severidade e curso da doença, condição ou sintomas, a disposição do paciente para a doença, condição ou sintomas, e o julgamento do tratamento médico.

[00171] Uma dose parental eficaz pode ser dada diariamente (em uma ou doses divididas), três vezes por semana, duas vezes por semana, ou mensalmente por meio de rotinas intravenosas, intradérmicas, subcutâneas ou outras como praticado pelo profissional médico para administrar fármacos.

[00172] Uma dose oral eficaz do composto da presente invenção a

um animal experimental ou humano pode ser formulado com uma variedade de excipientes e aditivos que realçam a absorção do composto pelo estômago e intestino delgado.

[00173] Uma dose oral eficaz poderia ser 10 vezes e até 100 vezes a quantidade da dose parental eficaz.

[00174] Uma dose oral eficaz pode ser dada diariamente, em uma ou divididas doses ou duas vezes, três vezes por semana, ou mensalmente.

[00175] O composto da presente invenção ou composições compreendendo o composto da presente invenção pode ser administrado oralmente; ou por injeção intravenosa; ou por injeção diretamente em um tecido afetado, como por exemplo por injeção em uma articulação artrítica. Em alguns exemplos o composto ou composição pode ser administrada topicalmente, como na forma de colírios, sprays nasais, unguedtos ou similar. Da mesma forma, outras técnicas tal como sistemas de liberação transdérmica, inalação ou similar podem ser empregadas.

[00176] Em algumas modalidades, os compostos descritos aqui podem ser co-administrados com um ou mais outros agentes terapêuticos. Em certas modalidades, os agentes adicionais podem ser administrados separadamente, como parte de um regime de dose múltiplo, dos compostos desta invenção (por exemplo, sequencialmente, por exemplo, em horários de sobreposição diferentes com a administração do composto da invenção. Em outras modalidades, estes agentes podem fazer parte de uma única forma de dosagem, misturados juntos com os compostos desta invenção em uma única composição. Em ainda outra modalidade, estes agentes podem ser dados como uma dose separada que é administrada a cerca do mesmo tempo que o composto da invenção. Quando as composições incluem uma combinação do composto desta invenção e um ou mais agentes terapêuticos

ou profilácticos adicionais, igualmente o composto e o agente adicional pode estar presente em níveis de dosagem dentre cerca de 1 a 100%, e mais preferivelmente entre cerca de 5 a 95% da dosagem normalmente administrada em um regime de monoterapia.

[00177] Em algumas modalidades, uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto despolimerizado ou da composição pode ser compatível e eficaz em combinação com uma quantidade terapeuticamente eficaz de vários compostos antioxidantes (por exemplo glicirrizina, ácido ascórbico, L-glutationa, cisteamina etc) como descrito na US 7,078,064.

[00178] Uma dose eficaz dada a um indivíduo animal ou humano com NASH e fibrose hepática significa a quantidade de um composto que, sozinho ou em combinação com quantidade de outro agente terapêutico, quando administrado como uma formulação parental, subcutânea, inalada, intra-articular, ocular, ou oral resulta em pelo menos uma redução de 10% em gordura hepatocelular, hepatócitos com degeneração em balão, célula inflamatória infiltrada, pelo menos uma redução de ponto na contagem de atividade de NAFLD, ou pelo menos uma redução de 10% em acúmulo de colágeno no fígado avaliado manchamento histológico com vermelho Sírius, ou reduzindo a progressão de acúmulo de tecido fibrótico no fígado em pelo menos 10%.

[00179] Uma dose eficaz dada a um assunto humano com NASH e fibrose hepática pode resultar em pelo menos uma redução de 10% em biomarcadores de soro associado com NASH, ou pelo menos uma melhoria de 10% em teor de gordura de hepatócito ou rigidez hepática como avaliado por ultra-som ou elastografia de MR, ou pelo menos uma melhoria de 10% em testes de função de fígado que medem função metabólica ou desvio no fígado, ou pelo menos uma redução de 10% em sintomas clínicos e complicações resultando em fibrose hepá-

tica e cirrose incluindo, porém, não limitado a sintomas e complicações resultando em metabólico reduzido e processos de eliminação (incluindo, porém, não limitado a bilirubina), capacidade sintética hepática reduzida (incluindo, porém, não limitada a albumina e proteínas de coagulação), hipertensão portal, e encefalopatia hepática.

[00180] Uma dose eficaz dada a um indivíduo humano com NASH e fibrose hepática significa uma melhoria em parâmetros clínicos ou progressão reduzida de parâmetros clínicos quando comparado a um grupo não tratado controle de indivíduos humanos incluindo, porém, não limitado a pelo menos uma redução de 10% em biomarcadores de soro associados com NASH, ou pelo menos uma melhoria de 10% em teor de gordura de hepatócito ou rigidez hepática como avaliado por ultra-som ou elastografia de MR, ou pelo menos uma melhoria de 10% em testes de função hepática medindo função metabólica ou desvio no fígado, ou pelo menos uma redução de 10% em sintomas clínicos e complicações que são o resultado de fibrose hepática e cirrose incluindo, porém, não limitado a sintomas e complicações resultando em metabólico reduzido e processos de eliminação (incluindo, porém, não limitado a bilirubina), capacidade sintética hepática reduzida (incluindo, porém, não limitada a albumina e proteínas de coagulação), hipertensão portal, e encefalopatia hepática.

[00181] Uma dose eficaz dada a um indivíduo animal ou humano com fibrose hepática ou cirrose devido a um distúrbio diferente de NASH significa a quantidade de um composto que, sozinho ou em combinação com quantidade de outro agente terapêutico, quando administrada como uma formulação parental, subcutânea, inalada, intra-articular, ocular, ou oral resulta em, por exemplo, pelo menos uma redução de 10% em acúmulo de colágeno no fígado avaliado por manchamento histológico com vermelho Sírius, ou reduzindo a progressão de acúmulo de tecido fibrótico no fígado em pelo menos 10%.

[00182] Uma dose eficaz dada a um indivíduo humano com fibrose hepática ou cirrose devido a um distúrbio diferente de NASH significa a quantidade de um composto que, sozinho ou em combinação com quantidade de outro agente terapêutico, quando administrado como uma formulação parental, subcutânea, inalada, intra-articular, ocular, ou oral resulta em, porém não é limitada a, pelo menos uma redução de 10% em biomarcadores de soro associada com fibrose hepática, ou pelo menos uma melhoria de 10% em rigidez hepática como avaliado por ultra-som ou elastografia de MR, ou pelo menos uma melhoria de 10% em testes de função hepática medindo função metabólica ou desvio no fígado, ou pelo menos uma redução de 10% em sintomas clínicos e complicações que são o resultado de fibrose hepática e cirrose incluindo, porém, não limitado a sintomas e complicações resultando em metabólico reduzido e processos de eliminação (incluindo, porém, não limitado a bilirubina), capacidade sintética hepática reduzida (incluindo, porém, não limitada a albumina e proteínas de coagulação), hipertensão portal, e encefalopatia hepática.

[00183] Uma dose eficaz dada a um indivíduo humano com fibrose hepática ou cirrose devido a um distúrbio diferente de NASH significa uma melhoria em parâmetros clínicos ou progressão reduzida de parâmetros clínicos quando comparado a um grupo não tratado controle de indivíduos humanos incluindo, porém, não limitado a pelo menos uma redução de 10% em biomarcadores de soro associado com fibrose, ou pelo menos uma melhoria de 10% em rigidez hepática como avaliado por ultra-som ou elastografia de MR, ou pelo menos uma melhoria de 10% em testes de função de fígado medindo função metabólica ou desvio no fígado, ou pelo menos uma redução de 10% em sintomas clínicos e complicações resultando em fibrose hepática e cirrose incluindo, porém, não limitado a sintomas e complicações resultando em metabólico reduzido e processos de eliminação (incluindo, porém,

não limitado a bilirubina), capacidade sintética hepática reduzida (incluindo, porém, não limitada a albumina e proteínas de coagulação), hipertensão portal, e encefalopatia hepática.

[00184] Uma dose eficaz dada a um indivíduo animal ou humano com fibrose de rim significa uma melhoria em parâmetros clínicos ou progressão reduzida de parâmetros clínicos quando comparado a um grupo não tratado controle de animais ou indivíduos humano incluindo, porém, não limitado a pelo menos uma redução de 10% em fibrose de rim avaliada por histologia, ou pelo menos uma melhoria de 10% em proteinuria, ou pelo menos uma melhoria de 10% em taxa de filtração glomerular, ou pelo menos uma melhoria de 10% em sinais clínicos e sintomas relacionados a insuficiência renal.

[00185] Uma dose eficaz dada a um indivíduo animal ou humano com fibrose pulmonar significa uma melhoria em parâmetros clínicos ou progressão reduzida de parâmetros clínicos quando comparado a um grupo não tratado controle de animais ou indivíduos humano incluindo porém não limitou a pelo menos uma redução de 10% em tecido fibrótico pulmonar avaliado em histologia, melhoria de 10% em volumes pulmonares, ou pelo menos uma melhoria de 10% em volumes expiratórios, ou pelo menos uma melhoria de 10% em sinais clínicos e sintomas relacionados a insuficiência pulmonar.

[00186] Uma dose eficaz dada a um indivíduo animal ou humano com fibrose de coração significa uma melhoria em parâmetros clínicos ou progressão reduzida de parâmetros clínicos quando comparado a um grupo não tratado controle de animais ou indivíduos humano incluindo, porém, não limitado a pelo menos uma redução de 10% em tecido fibrótico cardíaca avaliado em histologia, melhoria de 10% em contractilidade cardíaca, ou pelo menos uma melhoria de 10% em débito cardíaco, ou pelo menos uma melhoria de 10% em sinais clínicos e sintomas relacionados a insuficiência cardíaca.

[00187] Uma dose eficaz dada a um indivíduo animal ou humano com fibrose pancreática significa uma melhoria em parâmetros clínicos ou progressão reduzida de parâmetros clínicos quando comparado a um grupo não tratado controle de animais ou indivíduos humano incluindo, porém, não limitado a pelo menos uma redução de 10% em tecido fibrótico do pâncreas avaliado em histologia, 5% de melhoria em síntese ou secreção de enzimas exócrinas pancreáticas, ou pelo menos uma melhoria de 5% em enzimas endócrinas pancreáticas incluindo, porém, não limitada a insulina, ou pelo menos uma melhoria de 10% em sinais clínicos e sintomas relacionados a insuficiência pancreática.

[00188] Uma dose eficaz dada a um indivíduo animal ou humano com câncer, ou como um único agente ou em combinação com outra quimioterapia de câncer, imunoterapia, ou vacinas de tumor, significa uma melhoria em parâmetros clínicos ou progressão reduzida de parâmetros clínicos quando comparado a um grupo não tratado controle de animais ou indivíduos humano incluindo, porém, não limitado a pelo menos uma redução de 10% em tamanho de tumores, ou pelo menos uma redução de 10% em número de metástase de câncer, ou pelo menos um aumento de 10% em atividade de sistema imune contra as células de câncer, ou pelo menos uma melhoria de 10% em sinais clínicos e sintomas relacionados a câncer incluindo, porém, não limitado a melhoria em sobrevivência livre de progressão, ou sobrevivência total, ou efeitos adversos reduzidos de terapia, ou qualidade melhorada de vida.

[00189] Enquanto várias modalidades da presente invenção foram descritas, é entendido que estas modalidades são ilustrativas apenas, e não restritivas, e que muitas modificações e/ou modalidades alternativas podem ficar aparentes àqueles de experiência ordinária na técnica. Por exemplo, qualquer etapa pode ser realizada em qualquer or-

dem desejada (e qualquer quaisquer etapas desejadas podem ser adicionadas e/ou etapas desejadas podem ser deletadas). Portanto, será entendido que as reivindicações anexas são pretendidas abranger todas as tais modificações e modalidades que vêm dentro do espírito e escopo da presente invenção.

[00190] A invenção será também descrita nos seguintes exemplos. Deveria ser entendido que estes exemplos são apenas para propósitos ilustrativos e não serão interpretados como limitantes desta invenção de qualquer maneira.

EXEMPLOS

[00191] Para referência, o produto seletivamente despolimerizado da presente invenção (Composto G) se refere a um composto preparado de acordo com o Exemplo 1 descrito aqui, Composto D se refere a um polissacarídeo de referência preparado de acordo com os métodos descritos na US 7,893,252, incorporada aqui por referência em sua totalidade. Composto H se refere a um polissacarídeo de pectina despolimerizado molecular alto (90.000 a 140.000 D), um não preparou de acordo com Exemplo 1 descrito aqui, porém preparado com os métodos descritos na US 8,236,780, incorporada aqui por referência em sua totalidade. Composto S se refere a um polissacarídeo fabricado de pectina Cítrica USP de acordo com os métodos descritos na US 8,128,966. A invenção fornece processo industrial de pectina modificada, e usa em tratamento de câncer. E está incorporada aqui por referência em sua totalidade. Composto T se refere a um MCP comercial “Thorne Research Fractionated Pectin Powder 5 OZ” comprado em Amazon.com.

EXEMPLO 1: Fabricação de Composto G

[00192] O produto seletivamente despolimerizado da presente invenção foi preparado por um processo ilustrado na FIG. 1.

[00193] Pectina de maça USP HM (50 kg) foi dissolvida e aquecida

em água a 35-85 °C. 1 M de HCl ou NaOH foram adicionados para ajustar pH à solução em pH 5-7 e bem misturados. A mistura foi continuada durante 2 horas no ponto fixo 35-85 °C. 1M de NaOH ou HCl foi adicionado quando necessário para reajustar pH entre 5 e 7. Solução foi resfriada a 30°C. A 30 °C, pH foi ajustado entre 5 e 7.

[00194] CuSO₄ é adicionado à solução de pectina ajustada por pH para resultar em um concentração de CuSO₄ a 1 mM final. A solução de CuSO₄ a 1 mM foi misturada durante 30 minutos em uma temperatura dentre 10°C e 30°C.

[00195] Na conclusão dos 30 minutos, etapa de mistura de CuSO₄ a 1mM, 50 gramas de ascorbato de sódio foi adicionado (quantidade foi pré-calibrada para obter o MW desejado) e mistura durante 5 a 20 minutos. H₂O₂ foi adicionado iniciando com 0,02 e até 1,0 mols/kg de pectina (pré-calibrado para pectina MW de partida inicial) e a concentração de H₂O₂ foi mantida durante 4 horas (usando teste quantitativo, Sigma, St-Louis) enquanto o pH da solução foi mantido entre 4 e 7.

[00196] 5M de NaOH foi adicionado à solução para resultar em um pH de solução dentre 8 e 10. A solução ajustada por pH foi misturada durante 10-30 minutos. HCL concentrado foi em seguida adicionado à solução ajustada por pH para ajustar o pH da solução entre 4 e 5. A solução, uma vez ajustada em pH entre 4 e 5 pode ser continuada misturando durante 2 a 24 horas entre 2°C e 8°C.

[00197] Solução foi em seguida aquecida a 80°C durante 30-180 minutos e 1-5 kg de Ajuda de Filtro foi adicionado (Celite) à solução, e a solução com Celite adicionada foi agitada durante 30 minutos e em seguida filtrada. Os sólidos resultantes da filtração foram descartados.

[00198] O filtrado foi concentrado 1,5 - 3X sob vácuo, e em seguida ajustado por pH entre 3 e 5. Etanol quente ou isopropanol foi adiciona-

do em um peso de 50%. A mistura foi agitada 1-2 horas para precipitar produto, e a mistura foi em seguida filtrada. O filtrado foi descartado, deixando um precipitado branco a quase branco.

[00199] 96% de EtOH frio foi adicionado à solução e o suspensão resultante foi em seguida agitada durante 30 minutos. A solução foi filtrada e o filtrado foi descartado. A etapa de suspensão de EtOH a 96% foi repetida, seguida por uma filtração final e recuperação de um precipitado branco a quase branco.

[00200] O produto final deste processo rende uma composição com a estrutura molecular geral mostrada na FIG 2, como avaliado pelas análises descritas nos Exemplos 2, 3, 4, e 5 abaixo.

EXEMPLO 2: Análise de peso molecular médio por MALLS

[00201] Um sistema de detecção de dispersão de Luz a Laser de Multi-Ângulo pode ser usada para gerar uma plotagem de ZIMM que independentemente prediz o peso molecular de polímeros. O princípio do método de MALLS está baseado no fato que luz é mais fortemente dispersa por moléculas grandes do que por moléculas pequenas. A produção do detector de dispersão de luz é proporcional à multiplicação da concentração e o peso molecular médio das macromoléculas. Portanto, a forma do pico de dispersão da luz é assimétrica. Peso molecular versus o volume de eluição é obtido e pesos moleculares médios e distribuições de peso molecular médio podem ser calculados.

[00202] Tabela 1 abaixo e Figuras 3A - 3B ilustram uma determinação do peso molecular médio de um composto seletivamente despolimerizado da presente invenção por MALLS, indicando um peso molecular médio de cerca de 37 kilodaltons (kD) em solução de tampão de EDTA com um desvio padrão de 8%.

TABELA 1

| Número de estudo | Amostra | Resultados (Daltons) |
|------------------|-----------------------|----------------------|
| 3098-003 | 3098-003-00001 (EDTA) | 36,950 [STD8%] |

EXEMPLO 3: Análise por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)

[00203] Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) é uma técnica bem estabelecida usando HPLC para a caracterização de polímeros. SEC em combinação com detecção de Índice Refrativo (RI) é usada para a determinação de pesos moleculares médios de carboidratos poliméricos por perfil de tempo de retenção. FIG 4a demonstra o tempo de eluição de polissacarídeos padrões e FIG. 4b mostra o perfil de peso molecular do Composto G.

[00204] A partir desta análise e como mostrado na FIG 4b, faixa de peso molecular do Composto G é de 20 a 70 kDa.

EXEMPLO 4: Determinação da composição de Glicosila do Composto G

[00205] Análise de composição de glicosila foi realizada por cromatografia de gás combinada seguida por espectrometria de massa (GC/MS) dos derivados de per-O-trimetilsilila (TMS) dos glicosídeos de metila de monossacarídeo produzidos a partir da amostra por metanolise ácida.

[00206] Uma alíquota de cada amostra foi empregada e adicionada ao tubo com 20 ug de inositol como o padrão interno. Glicosídeos de metila foram em seguida preparados a partir da amostra seca seguindo metanolise em 3 M de HCl em metanol a 80 °C (6 horas), seguido por re-N-acetilação com piridina e anidrido acético em metanol (para detecção de amino açúcares). A amostra foi em seguida per-O-trimetilsililada por tratamento com Tri-Sil (Pierce) a 80 °C (0,3 horas). Estes procedimentos foram previamente realizados como descrito em Merkle e Poppe (1994) *Methods Enzymol.* 230: 1-15; York, e outro (1985) *Methods Enzymol.* 118:3-40. Análise de GC/MS dos metil glicosídeos TMS foi realizada em um AT 6890N GC conectado a um 5975B MSD, usando uma coluna capilar de sílica fundida por Supelco EC-1 (30m × 0,25 mm ID).

[00207] Os resultados da análise de composição são listados na

tabela abaixo:

TABELA 2:

% em Mol de resíduos de monossacarídeo do Composto G por GC-MS

| Amostra | Resíduo de glicosila | Massa (g)* | %¹ em Mol |
|-----------|--------------------------------|------------|-----------|
| Comp G | Arabinose (Ara) | 13,4 | 5,6 |
| Lote # | Rhamnose (Rha) | 9,0 | 3,4 |
| S126K4208 | Fucose (Fuc) | n.d. | - |
| | Xilose (Xyl) | 5,2 | 2,2 |
| | Ácido Glucurônico (GlcA) | n.d. | - |
| | Ácido Galacturônico (Ga-IA) | 220,8 | 71, 7 |
| | Manose (Man) | n.d. | - |
| | Galactose (Gal) | 45,4 | 15,9 |
| | Glicose (Glc) | 3,3 | 1,2 |
| | N-AcetylGalactosamina (GalNAc) | n.d. | - |
| | N-AcetylGlucosamina (GlcNAc) | n.d. | - |
| | N-AcetylManosamina (ManNAc) | n.d. | - |
| | Total | 297,1 | CHO=99% |

- Desvio padrão de ensaio não foi determinado

EXEMPLO 5: Determinação de ligações Glicosídicas e Estrutura por H1 e C13 RMN.

[00208] Espectroscopia de RMN revela assinaturas moleculares individuais e ligações, fornecendo um tipo de impressão digital analítica para moléculas de carboidrato complexas. Dois espectros de RMN dimensionais foram avaliados para revelar a impressão digital molecular da composição da presente invenção, Composto G, e comparação

a Composto S.

[00209] Para espectroscopia de RMN, as amostras do Composto G e Composto S foram dissolvidas em 0,7 mL D₂O (99,96% de D), e transferidas em um tubo de RMN de 5-mm (Wilmad). Próton 1-D e 2-D TOCSY, NOESY, gradiente aumentado COSY (gCOSY), HSQC, e espectros de RMN gHMBC foram adquiridos em um espectrômetro Varian Inova-500 MHz a 343 K (70°C). Trocas químicas foram medidas relativo a acetona interna (¹H=2.225 ppm, ¹³C=31 ,07 ppm).

[00210] Tabela 3 debaixo de indica relações aproximadas de galacturonato de metila para ácido galacturônico, e de galacturonato de metila e ácido galacturônico para galactose, obtidas a partir de 2-D HSQC RMN do Composto G:

TABELA 3

| | Composto G | SD* |
|-------------------|------------|-----|
| GalA-6-OMe/GalA | 1:2 | |
| GalA(-6-OMe)/GalA | 2:1 | |

[00211] Os componentes principais no Composto G são ácido galacturônico 4-ligado, galacturonato de metila 4-ligado, e galactose 4-ligada. Ramnose está claramente presente no espectro de HSQC. Tabela 4 contém a designação espectral de RMN do Composto G.

TABELA 4

| Resíduo | posição | | | | | |
|------------------------------------|-----------------|-------|------|------|------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 4- α -GalAp | ¹ H | 5.08 | 3.77 | 3.98 | 4.42 | 4.69 |
| | ¹³ C | 100.0 | 69.5 | 69.9 | 79.3 | 72.3 |
| 4- α -GalApOMe ^a | ¹ H | 4.92 | 3.75 | 3.99 | 4.47 | 5.10 |
| | ¹³ C | 100.8 | 69.5 | 69.9 | 79.3 | 71.5 |
| 4- β -Galp | ¹ H | 4.62 | 3.69 | 3.77 | 4.16 | 3.72 |
| | ¹³ C | 105.5 | 73.1 | 74.2 | 78.5 | 75.4 |
| t- α -Araf | ¹ H | 5.17 | 4.13 | 3.97 | 4.06 | 3.83/3.73 |
| | ¹³ C | 107.8 | 82.0 | 77.4 | 84.8 | 62.1 |
| 5- α -Araf | ¹ H | 5.08 | 4.14 | 4.02 | 4.21 | 3.88/3.80 |
| | ¹³ C | 108.6 | 82.0 | 77.7 | 83.2 | 67.6 |
| Rhap | ¹ H | n.d. | n.d. | 3.89 | 3.40 | 3.79 |
| | ¹³ C | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 17.6 |

^aressonância de metila: 3,81/539 ppm

[00212] A FIG 5a mostra o espectro de RMN bidimensional para

Composto G e FIG 5b mostra o espectro de RMN bidimensional para Composto S.

[00213] Comparação de espectros de RMN bidimensionais de amostras diferentes de material de pectina modificado é um método poderoso para avaliar estruturas diferentes.

[00214] A FIG 5c mostra os espectros de sobreposição do Composto G e Composto S, revelando as diferenças marcadas nos espectros de RMN bidimensionais destes dois compostos. As posições que são circuladas estão no espectro do Composto G, porém não no Composto S. Isto indica diferenças estruturais importantes entre Composto G e Composto S.

[00215] Esta análise demonstra diferenças estruturais claras entre Composto G e Composto S, feitos por um método industrial diferente. Estas diferenças estruturais são evidentes em análises de RMN bidimensionais quando a análise de composição química, que mede apenas a composição de monossacarídeo não mostra diferenças totais.

[00216] Impressão digital de RMN bidimensional pode ser incluída no certificado de análise para bateladas de GMP de Composto G como uma avaliação precisa da estrutura molecular complexa.

EXEMPLO 6: Determinação de Citotoxicidade de Composto G para Linhagens Celulares Cultivadas

[00217] Uma das características proeminentes de compostos de pectina modificados que foram informadas (US 8,128,966 e US 2012/0149658) é sua citotoxicidade em linhagens celulares de vários tipos, incluindo a indução de apoptose. Por exemplo, US 8,128,966 descreve pectinas modificadas que induzem apoptose em células de câncer, tal como linhagem celular de melanoma B16-F10.

[00218] Ao contrário os resultados da US 8,128,966, a pectina modificada da presente invenção, foi mostrada não ter nenhuma citotoxicidade quando usada em uma variedade de linhagens celulares, inclu-

indo células de melanoma B16-F10.

[00219] Linhagem de célula estrelada hepática humana, LX-2 é habitualmente usada como uma ferramenta para análise de fibrose hepática. As células de LX-2 normalmente proliferam em 2% de meio rico em soro de FC. Entretanto, uma vez enfatizado em 0,1% de soro de FC, células de LX-2 entram através de mudanças patológicas similares como estabelecido no fígado fibrótico. Citotoxicidade foi avaliada usando Composto D, Composto H, e Composto G.

[00220] A FIG 6a mostra os resultados de um ensaio de proliferação utilizando a incorporação de tritio rotulado por timidina em células de LX-2 crescentes. Não houve diferença de células de controle em incorporação de timidina em 48 horas de cultura quando células foram incubadas com 1 mg/mL de Composto D, Composto H, ou Composto G.

[00221] A FIG 6b mostra os resultados de um ensaio de viabilidade de célula utilizando uma tintura vital que é empregada por células não viáveis e excluídas a partir de células viáveis. Não houve diferença de células de controle em viabilidade de célula em 48 horas de cultura quando células foram incubadas com 1 mg/mL de Composto D, Composto H, ou Composto G.

[00222] A presença de apoptose foi da mesma forma avaliada usando o *kit* de apoptose de anexina (eBioscience). Anexinas são uma família de proteínas de ligação de fosfolipídeo dependente de cálcio que preferencialmente ligam fosfatidilserina (PS). Sob condições fisiológicas normais, PS está predominantemente localizado no folheto interno da membrana plasmática. Em iniciação de apoptose, perdas de PS é distribuição assimétrica através da bicamada de fosfolipídeo e é translocada ao folheto de membrana extracelular marcando células como alvos de fagocitose. Uma vez na superfície exterior da membrana, PS pode ser Anexina V rotulada fluorescentemente detectada de

uma maneira dependente de cálcio.

[00223] A FIG 6c mostra os resultados análise de FACS (classificação de célula ativada por Fluorescência) de células de LX-2 para avaliar apoptose que não mostrou evidência de apoptose em células tratadas com Composto D ou Composto G versus células de controle (véículo tratado).

[00224] Como um outro teste para apoptose, células de LX-2 foram examinadas para a presença de fragmentação de DNA. FIG 6d mostra que não houve evidência de fragmentação de DNA em células tratadas com Composto D (D1 ou D2), Composto H ou Composto G quando comparado a controle.

[00225] Macrófagos são integralmente envolvidos em processos inflamatórios e fibróticos. Desse modo, uma linhagem celular de macrófagos THP-1 (ATCC® Number: TIB-202™) foi avaliada quanto ao efeito do Composto G em citotoxicidade como mostrado na FIG. 7. A linhagem de célula THP-1 é um monócito tipo linhagens celulares co-lhidas de sangue periférico de paciente (*Homo sapiens*) com Leucemia Monocítica Aguda (AML) (vide Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42: 1530-1536, 1982).

[00226] As células de THP-1 foram suspensas em meio de ensaio contendo 10% de FBS. Cerca de 25.300 células/cavidade foram transferidas a 100ul/cavidade em placas de 96 cavidades. Em 24 horas o meio de cultura foi mudado em meios frescos e as células foram incubadas durante a noite. Compostos teste foram serialmente diluídos em meio de ensaio contendo 10% de FBS e transferem 100 ul/cavidade às células de monócito crescentes THP-1. O volume de ensaio final foi 200 ul/cavidade contendo 10% de FBS, 2X Gentamicina, e os seguintes artigos de teste: Composto G da presente invenção e Composto D, um produto de galactomanano ou na presença de digitoxina. As célu-

las foram incubadas durante 3 dias com os artigos de teste. Depois de remover 50 ul de sobrenadante para outro teste, citotoxicidade/crescimento foi medido adicionando-se 15 ul de Promega "CellTiter 96® Aqueous One Solution" às 96 cavidades e viabilidade foi monitorada em OD 490nm depois de 1-7,5 horas. O CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay é um método colorimétrico para determinar o número de células viáveis em proliferação, citotoxicidade ou ensaios de quimiosensibilidade. O CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent contém um composto de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno; MTS] e um reagente de acoplamento de elétron (etossulfato de fenazina; PES). PES realçou estabilidade química, que permite ser combinado com MTS para formar uma solução estável para viabilidade de célula de detecção em meio de cultura *in-vitro*.

[00227] A FIG. 7 mostra que quantidades crescentes de Composto G aplicadas a células de THP-1 não resultaram em citotoxicidade.

[00228] A linhagem celular de melanoma B16-F10 foi previamente usada como um ensaio para atividade de pectinas modificadas. Desse modo, células de B16-F10 foram avaliadas para o efeito do Composto G em citotoxicidade.

[00229] A linhagem celular de melanoma B16-F10 (ATCC® Number: CRL-6475™) é uma mistura de células fusiformes e semelhantes a epitelial de melanoma de pele de camundongo (*Mus musculus*, Cepa: C57BL/6J (Vide Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo*. Cancer Res. 35: 218-224, 1975.)

[00230] Células de melanoma B16-F10 foram transferidas em um meio fresco (DMEM - 10% de Soro Bovino Fetal - FBS). Cerca de 2.900 células/cavidade (passagem #4) foram transferidas em 100 ul/cavidade em placas de 96 cavidades para incubação durante a noi-

te. Em 24 horas o meio de cultura foi mudadas em meio livre de soro fresco e incubado durante a noite. Compostos teste foram serialmente diluídos em meio de ensaio contendo 1% de FBS e 100 ul/cavidade foi transferido às células de melanoma crescentes. O volume de ensaio final foi 200 ul/cavidade contendo 1% de FBS, 2X Gentamicina, e composto G da presente invenção, Composto D, um produto de galactomanano ou 5-fluorouracila. As células foram incubadas durante 3 dias com os compostos teste. Citotoxicidade/crescimento foi medido adicionando-se 20 ul de Promega "CellTiter 96® Aqueous One Solution" para as 96 cavidades e monitorado em OD 490nm depois de 1 hora. O CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay é um método colorimétrico para determinar o número de células viáveis em proliferação, citotoxicidade ou ensaios de quimiossensibilidade. O CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent contém um composto de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno; MTS] e um reagente de acoplamento de elétron (etossulfato de fenazina; PES). PES aumentou estabilidade química, que permite isto ser combinada com MTS para formar uma solução estável para viabilidade de célula de detecção em meios de cultura *in-vitro*.

[00231] A Figura 8 mostra que quantidades crescentes de Composto G aplicadas a células de B16-F10 não resultaram em citotoxicidade. Isto representa uma diferença clara da função de outros compostos de pectina modificados previamente descritos.

[00232] Células de PBMC são célula primária extraída de sangue total usando ficol, um polissacarídeo hidrofílico. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estão integralmente envolvidas em processos inflamatórios e fibróticos. Desse modo, PBMC foram avaliados quanto ao efeito do Composto G em citotoxicidade.

[00233] A Figura 9 mostra que Composto G de três diferentes lotes

aplicados a PBMCs não resultou em citotoxicidade. Composto G em concentrações de até 500 ug/mL não tiveram nenhum efeito no crescimento de PBMC. Citotoxicidade foi medida usando ensaio de MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) Promega USA.)

[00234] A Figura 10 mostra que quantidades crescentes do Composto G aplicadas a células de fibroblasto pulmonares cultivadas não resultaram em citotoxicidade. A linhagem celular MRC-5 é um fibroblasto normal que foi derivado de tecido de pulmão normal (*Homo sapiens* (humano) macho (ATCC Catalog No. CCL-171™)). Quantidades crescentes dos seguintes artigos de teste: Composto G da presente invenção, Composto D, um produto de galactomanano foi testado usando um CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) - o Promega USA. Figura 10 mostra que Composto G a até 800 ug/mL não tiveram efeito no crescimento de fibroblasto pulmonar *in vitro*.

[00235] O sumário destes dados mostra convincentemente que Composto G não é citotóxico a células e não induz apoptose. Isto está em contraste com todos os outros relatórios de materiais de pectina modificados informados.

[00236] **EXEMPLO 7: Ensaio In-Vitro Para Efeito Anti-inflamatório Usando Células Primárias de PBMC**

[00237] Composto G foi avaliado quanto a sua atividade biológica em condições inflamatórias. Células múltiplas estão envolvidas em e ativadas no processo inflamatório. Um tipo de célula principal neste processo são Células Mononucleares de Sangue Periférico (PMBCs), uma célula primária habitualmente usa como modelo *in-vitro* anti-inflamatório, que são ativadas por mediadores inflamatórios, recrutados em sítios de inflamação, para transformar em macrófagos de tecido, e aumentar o processo inflamatório. Portanto, PMBCs foram usa-

dos como um modelo *in vitro* para avaliar o efeito de Composto G.

[00238] O ensaio *in-vitro* para inflamação foi desenvolvido enfatizando-se PBMC com endotoxina microbiana (lipopolissacarídeos microbianos) e medindo por secreção de TNF alfa, uma citocina principal e biomarcador para inflamação. PBMC foi re-suspensão em meio de ensaio contendo 10% de FBS (Gibco lot#749413), 2X Gentamicina, e L-Glutamina. PMBC foi transferido 90 µl/cavidade em placa de ensaio (169.000 células/cavidade).

[00239] 90 µl/cavidade de meio de ensaio foi adicionado em placa de ensaio em um volume total de 180 µl/cavidade durante aproximadamente 16 horas. LPS (toxina microbiana) foi serialmente diluída em meio de ensaio. 20 µl/cavidade de LPS foi adicionado para avaliar placa em um volume final de 200 µl/cavidade e incubado durante 7 horas a 37 graus C. 60 µl/cavidade foram removidos para ensaio de ELISA de TNF- α (Transformando Fator Nuclear alfa). As amostras de 60 µl foram diluídas 1:4 com diluente de ELISA (volume total é 240 µl) e 100 µl/cavidade de amostra foram transferidos em uma placa de ELISA. h-TNF- α foi analisado usando um *Kit* de Desenvolvimento de ELISA (PeproTech, cat#900-K25, lot#0509025), com TNF- α Humano como padrão em uma placa de ELISA. 100 µl de Substrato Líquido de ABTS foi adicionado a cada cavidade e OD foi lido em 405 nm com uma correção de comprimento de onda fixa a 650nm.

[00240] O plano de placa usado é mencionado abaixo:

| Plano de placa | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|---|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | h-TNF α STD; 5ng/ml (1:2) | LPS; 400ng/ml (1:2) | | | | | | | | h-TNF α STD; 5ng/ml (1:2) | | | |
| B | | Composto S; 1,0 mg/mL (1:2); meio de ensaio contend 50 ng/mL LPS | | | | | | | | | | | |
| C | | Composto D; 1,0 mg/mL (1:2); meio de ensaio contend 50 ng/mL LPS | | | | | | | | | | | |
| D | | Composto G; 1,0 mg/mL (1:2); meio de ensaio contend 50 ng/mL LPS | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | |

[00241] A FIG. 11 graficamente demonstra resultados de Placa 364 com ELISA de h-TNF alfa. Composto G a 0,5 mg/mL reduziram 50% de secreção de TNF-alfa enfatizando-se células primárias de PBMC. A redução de secreção de TNF-alfa é significativamente mais alta do que polissacarídeos de referência do Composto D ou Composto S testado.

[00242] A capacidade do Composto D, Composto H, e Composto G para inibir secreção de TNF-alfa em PBMC foi diretamente comparada, como mostrado na FIG 12. Composto H foi produzido usando o método descrito na US 8,236,780 foi produzido. Composto D e Composto H não mostraram qualquer capacidade para reduzir secreção de TNF-alfa de células de PBMC, na realidade Composto H pareceu aumentar TNF-alfa. Em contraste, Composto G significativamente inibiu secreção de TNF-alfa.

[00243] Composto G foi mostrado ser um inibidor potente de um modelo *in vitro* de inflamação. Tal atividade foi mostrada estar ausente do Composto S ou Composto H, compostos de pectina modificados feitos através de processos diferentes de Composto G. Portanto, resultados dos Exemplos 6 e 7 mostraram que Composto G é pectina modificada tendo propriedades não-citotóxicas e anti-inflamatórias únicas que não foram descritas para outros compostos derivados de pectina conhecidos.

EXEMPLO 8: Indução *In-vitro* de Fibrogênese em linhagem de Célula estrelada LX-2 hepática.

[00244] Em outras experiências, os inventores mostraram que linhagens de célula estrelada cultivadas humanas (LX-2) expressa e segregava no meio galectina-1 e galectina-3 enfatizando as células reduzindo-se o soro de FC nos meios de cultura de 2% a 0,1%.

[00245] Linhagem de célula estrelada hepática humana, LX-2 é habitualmente usada como uma ferramenta para análise de fibrose hepática.

As células de LX-2 proliferam normalmente em 2% de meio rico em soro de FC. Entretanto, uma vez enfatizada em 0,1% de soro de FC que os mesmos entram através de mudanças patológicas similares como estabelecido em fígado fibrótico

[00246] O Composto G pode da mesma forma modular, aumentar ou diminuir em moléculas de células estreladas LX-2 ou biomarcadores que estão envolvidos em fibrogênese, incluindo, porém, não limitado a colágeno I, II, III, IV, metaloproteases, inibidores de metaloproteases, e citocinas.

[00247] O Composto G pode da mesma forma modular expressão de citocinas e lipídios e espécies de oxigênio reativas em macrófagos hepática, ou células de Kupffer.

[00248] O Composto G pode da mesma forma modular a expressão de genes hepatocelulares, captação e metabolismo de lipídios e espécies de oxigênio reativas.

[00249] O efeito do Composto G na expressão de galectina-3 igualmente em compartimentos intra e extra-celulares foi avaliado, como mostrado na FIG 13. Enquanto meio rico de soro produziram quantidade desprezível de galectina-3, quando células de LX-2 (linhagem de célula estrelada humana) foram enfatizadas com meio de crescimento esvaziado de soro de bezerro fetal (em apenas 0,1% de meio de soro), um modelo que foi mostrado ser um modelo *in-vitro* para fibrogênese, galectina-3 foi expressado alcançando máximo a cerca de 5 a 7 dias pós cultura em 0,1% de meio de soro. Uma técnica de manchamento imunoquímica demonstrou expressão aumentada de galectina-3 no dia 6 pós-ênfase em 0,1% de soro, enquanto a adição do composto G foi mostrada significativamente suprimir a expressão de galectina-3.

EXEMPLO 11: Avaliação de Terapia em um Modelo de Fibrose hepática induzida por TAA

[00250] Para determinar se o composto da presente invenção tem uma atividade biológica antifibrótica em animais vivos, um teste de viabilidade preliminar foi conduzido *in vivo*. Fibrose hepática severa foi induzida por toxicidade química de administração quinzenal de tioacetamida (TAA). Composto G foi determinado IP a 90 mg/kg semanalmente durante 4 semanas, e Composto D foi determinado em dose de 180 mg/kg semanalmente durante 4 semanas. O desígnio experimental é mostrado na Figura 14.

[00251] Depois de 8 semanas de tratamento com TAA, manchamento vermelho Sírius hepática fibrótico (controle de veículo) mostrou infiltração extensiva de tecido fibrótico (FIG. 15). Em contraste, o material fibrótico foi notadamente reduzido, e quase eliminado em algumas áreas no fígado a partir de um animal tratado com Composto G (FIG. 15).

[00252] Análise estatística de grau de fibrose e colágeno percentual foi realizada com animais tratados com Composto G e Composto D (FIG. 16).

[00253] A FIG. 16 mostra um redução estatisticamente significante em área fibrótica medida por análise morfométrica digital de seções hepática manchadas com vermelho Sírius quando animais foram tratados com Composto G e Composto D quando comparado a controles de veículo, com maior redução vista com Composto G quando comparado a Composto D.

[00254] Estas experiências demonstram atividade antifibrótica do Composto G, que correlata com seu efeito anti-inflamatório demonstrado em linhagens celulares.

EXEMPLO 12: Avaliação de Terapia em Modelo de NASH de estatose hepática de Camundongo

[00255] O efeito de carboidratos de ligação de galectin na terapia de doença hepática experimental e NASH foi examinado. Camundongos de STAM em que diabetes foi induzida e uma dieta hiperlipídica foi

administrada foram usados como um modelo experimental. Este é um modelo provado em que os camundongos constantemente desenvolvem NASH com acúmulo de gordura de hepatócito, evidência de toxicidade de hepatócito, infiltrados inflamatórios portais e lobulares, fibrose peri-senoidal, fibrose avançada com formação de nódulo, cirrose, e ultimamente carcinoma hepatocelular em uma certa porcentagem de animais. Camundongos de NASH IV foram tratados quinzenalmente em 9-12 semanas de estudo, como mostrado na Figura 17a-b.

[00256] Camundongos de STAM foram usados para explorar o efeito do Composto G. No estudo foram testados dois compostos, Composto D (como descrito na US 7,893,252) e Composto G nos resultados histopatológicos associados com NASH no fígado (Figura 17). No modelo de STAM, camundongos neonatais foram determinadas uma injeção de estreptozotocina que resulta em insuficiência pancreática endócrina e diabetes melito. Em quatro semanas de idade, uma dieta hiperlipídica foi introduzida que foi continuada através da experiência. Este modelo resulta em uma doença reproduzível que inclui esteatose epática (FL), NASH, NASH com fibrose (Fib), formação de nódulo (N) e em uma certa porcentagem de carcinoma hepatocelular de animais (HC). Neste desígnio experimental, terapia de fármaco foi iniciada em 8 semanas e continuada para um total de 4 semanas. Composto D foi administrado em uma dose de 120 mg/kg dissolvida em vezes solução salina normal intravenosamente duas vezes por semana. Composto G foi administrado em uma dose de 60 mg/kg dissolvido duas vezes em solução salina normal intravenosamente duas vezes por semana.

[00257] A Figura 18 mostra que camundongos em todos os grupos ganharam peso durante o tempo da experiência sem diferenças entre grupos. Este resultado indica em um nível total que houve pouco efeito tóxico dos tratamentos nos animais e qualquer mudança detectada é improvável devido à saúde global dos animais. No geral houve 2 mor-

tes no grupo veículo (2/12, 17%) e um no grupo tratado com Composto D (1/12, 8%), todos relacionados a doença hepática como determinado por autópsia pelo veterinário. Não houve nenhuma morte no grupo tratado com Composto G. Esta atividade *in vivo* de falta de toxicidade nos camundongos correlata com a falta de citotoxicidade vista em experiências de linhagem celular *in vitro*.

[00258] A contagem de atividade de NAFLD foi usada para avaliar severidade de doença e produz pontos para três aspectos de patologia de NASH incluindo, esteatose (0 (< 5%), 1 (5-33%), 2 (33-66%), ou 3 (>66%)), hepatócito em balão (0 (nenhum), 1, (poucos), ou 3 (muitos)), e inflamação lobular (0 (nenhum foco), 1 (< 2 foci/200x campo), 2 (2-4 foci/200x campo), ou 3 (>4 foci/200x campo)). O número total de pontos é a contagem de atividade de NAFLD.

[00259] A Figura 19 mostra uma representação gráfica com valores estatísticos da contagem de atividade de NAFLD nos três grupos experimentais. Houve uma melhoria em contagem de atividade de NAFLD em animais tratados com Composto G e menos de um efeito com Composto D.

[00260] A Figura 20 mostra uma representação gráfica com valores estatísticos do colágeno percentual nos três grupos experimentais. Vermelho Sírius é uma mancha histológica que tem uma afinidade específica por fibras de colágeno, manchando-os de vermelho, e é portanto uma ferramenta quantitativa para avaliar o grau de fibrose em biópsias hepática. A área de manchamento vermelho Sírius em seções histopatológicas hepática de cada um dos três grupos de tratamento foi avaliada usando análise morfométrica ajudada por computador. Animais em ambos os grupos de tratamento precoce e recentes tiveram uma redução marcada em área proporcional de colágeno quando tratada com Composto G. Tratamento com Composto D tem um efeito intermediário na área proporcional de colágeno entre controle de veí-

culo e Composto G. Estes resultados demonstrados que tratamento com Composto G significativamente reduzem fibrose hepática em camundongos com NASH.

[00261] Os resultados nos camundongos de NASH (Figura 17-20) estendem e confirmam os resultados encontrados nos ratos tratados com TAA em fibrose hepática. Adicionalmente, estas experiências mostram um efeito anti-inflamatório marcado do Composto G com uma redução na contagem de atividade de NAFLD (esteatose, hepatócito em balão, e infiltrado inflamatório). A combinação destes efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos em um modelo animal de NASH correlata com o efeito anti-inflamatório demonstrado no modelo de cultura de célula PBMC.

[00262] É entendido que os exemplos e modalidades descritas aqui são para propósitos ilustrativos e que várias modificações de mudanças em função dos mesmos serão incluídas dentro do espírito e esfera deste pedido e escopo das reivindicações anexas. Toda a publicação, patentes e pedidos de patente citados aqui estão incorporados aqui por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de arabinogalacto-ramnogalacturonano, caracterizado pelo fato de que compreende uma cadeia principal de resíduos de ácido galacturônico ligado a 1,4 (GAIA) e galacturonato de metila (MeGalA), ligado a heteropolímeros ramificados de oligômeros alternados de ramnose ligada a α -1,2 e resíduos GAIA ligados a α -1,4, os resíduos de ramnose portando uma ramificação primária de oligômeros de resíduos de 1,4- β -D-galactose, resíduos de 1,5- α -L-arabinose, ou combinações dos mesmos,

sendo que o oligômero de resíduos de 1,4- β -D-galactose, resíduos de 1,5- α -L-arabinose, ou combinações dos mesmos, representam pelo menos 8 por cento molar do teor molar de carboidrato total,

sendo que o composto apresenta um grau de metoxilação que varia de 40% a 70%,

sendo que o composto apresenta uma razão de galacturonato de metila para ácido galacturônico variando de 2:1 a 1:2,

e

sendo que o composto é capaz de reduzir a secreção de citocina TNF-alfa de monócitos estressados com endotoxina.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o é capaz de reduzir a secreção de TNF-alfa por monócitos/macrófagos ativados em pelo menos 25%.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(i) a cadeia principal de resíduos de ácido galacturônico ligado a 1,4 e galacturonato de metila representa entre 55 a 85 por cento molar do teor molar de carboidrato total,

o heteropolímero ramificado de ramnose ligada a α -1,2 alternada e os resíduos de GAIA ligados a α -1,4 representam entre 1 e 6 por cento molar do teor molar de carboidrato total,

o oligômero 1,4- β -D-galactose da ramificação primária representa entre 6 a 15 por cento molar do teor molar de carboidrato total, e o oligômero 1,5- α -L-arabinose da ramificação primária representa entre 2 a 8 por cento molar do teor molar total de carboidratos, como definido por cromatografia gasosa/espectrometria de massa.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda resíduos de xilose, glicose, fucose, ou uma combinação dos mesmos.

5. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta um peso molecular médio variando de 2 kDa a 80 kDa, de 20 kDa a 70 kDa, de 5 kDa a 55 kDa ou de 2 a 70 kDa.

6. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta uma razão de galacturonato de metila mais ácido galacturônico para galactose variando de 4:1 a 7:1.

7. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(i) não induz viabilidade diminuída quando usado para tratar células estreladas hepáticas humanas imortalizadas LX2, ou

(ii) o composto é capaz de reduzir a expressão de galectina-3 ou uma diminuição substancial na secreção de galectina-3 quando usado para tratar células estreladas hepáticas humanas imortalizadas LX2 estressadas que produzem galectina-3.

8. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os resíduos de 1,4- β -D-galactose e 1,5- α -L-arabinose estão presentes em uma razão de 2:1.

9. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que apresenta uma razão de galacturonato de metila mais ácido galacturônico para galactose variando de 4:1 a 8:1.

10. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracteri-

zado pelo fato de que é substancialmente livre de endotoxinas microbianas, pesticidas agrícolas, herbicidas agrícolas, cobre, metais pesados, proteínas, compostos nitrogenados, ou qualquer combinação dos anteriores.

11. Composição para uso em formulações terapêuticas, caracterizada pelo fato de que compreende um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em um veículo farmacêutico aceitável.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que pode ser administrada parenteral por meio de uma rota intravenosa, subcutânea ou oral.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um agente terapêutico.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que o agente terapêutico é um composto antioxidante, um agente anti-inflamatório, vitaminas, um suplemento nutracêutico ou combinações dos mesmos.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 11, para uso no tratamento de esteatohepatite não alcoólica, fibrose, distúrbios inflamatórios e autoimunes, condições neoplásicas, câncer, fibrose hepática, fibrose renal, fibrose pulmonar ou fibrose cardíaca.

16. Uso de um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que é para preparação de formulações terapêuticas intravenosas, subcutâneas ou orais para tratamento de esteatohepatite não alcoólica, fibrose, distúrbios inflamatórios e autoimunes, condições neoplásicas ou de câncer, e/ou para tratamento de fibrose hepática, fibrose renal, fibrose pulmonar, ou fibrose cardíaca.

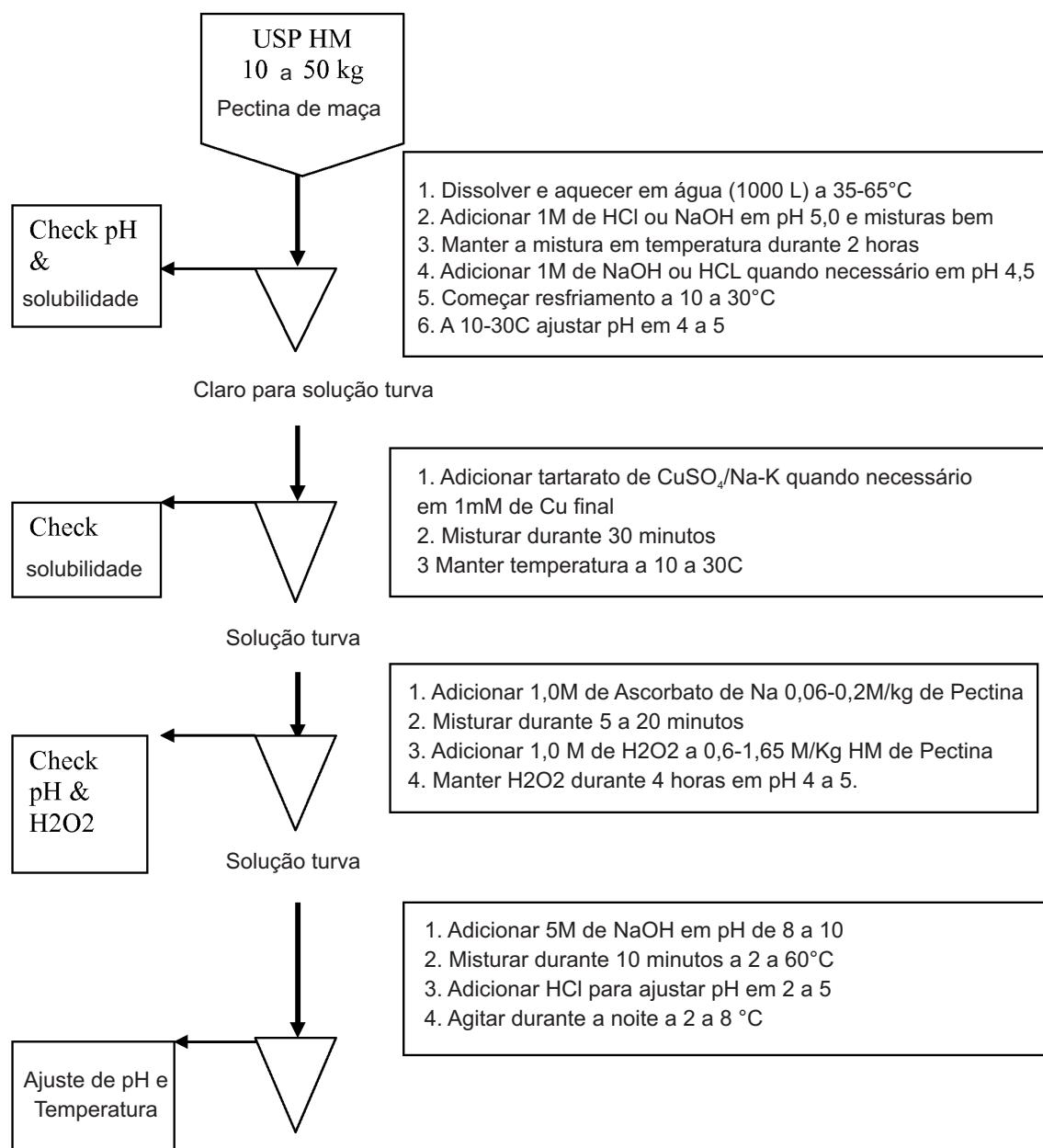


FIG. 1

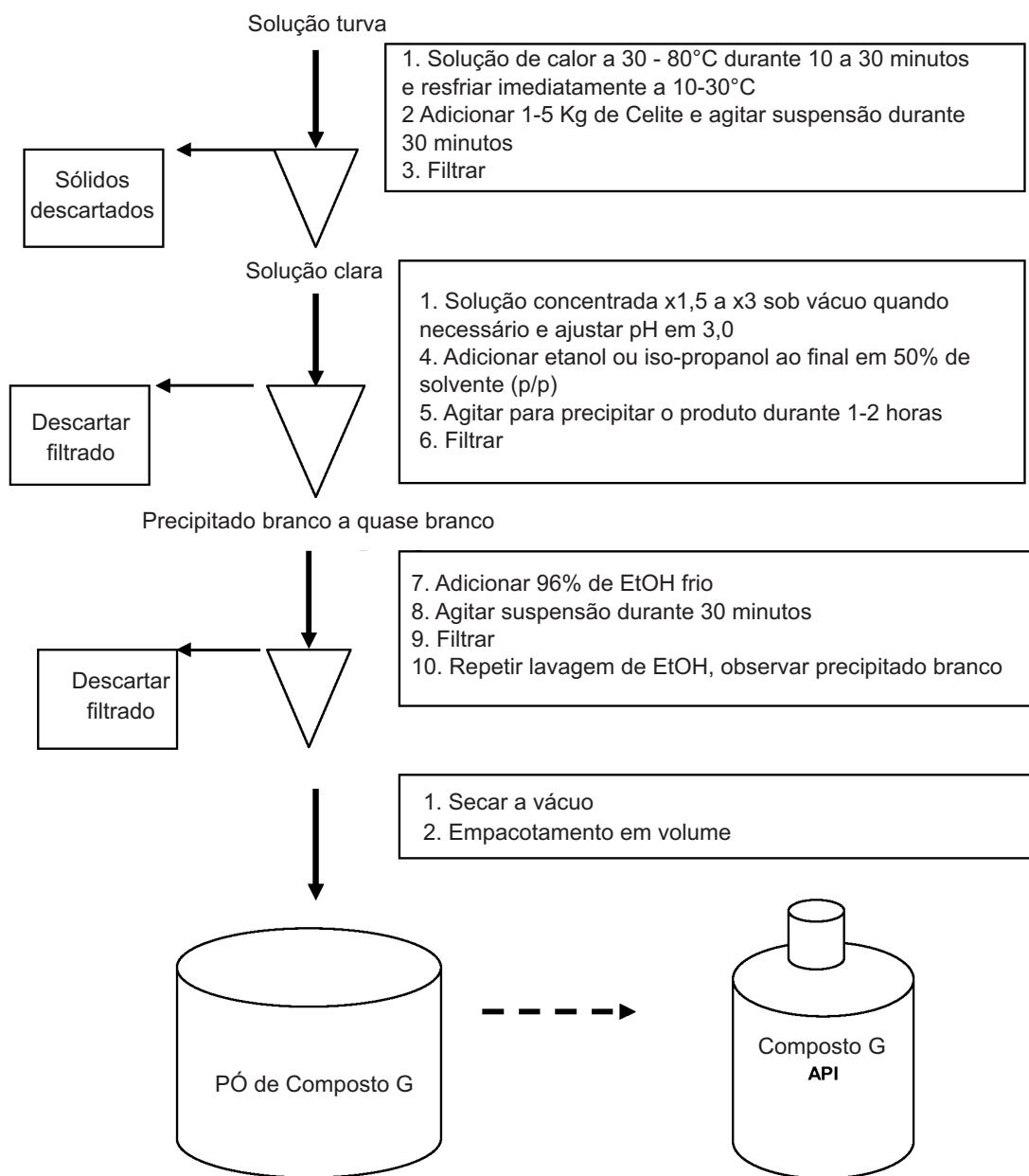


FIG. 1
(Continuação)

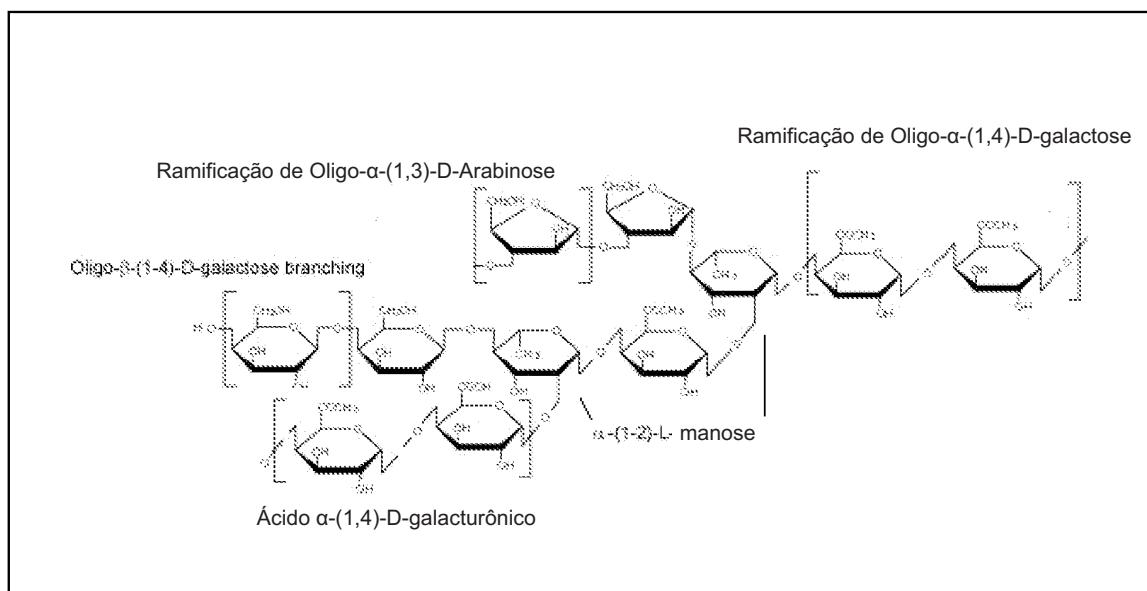


FIG. 2

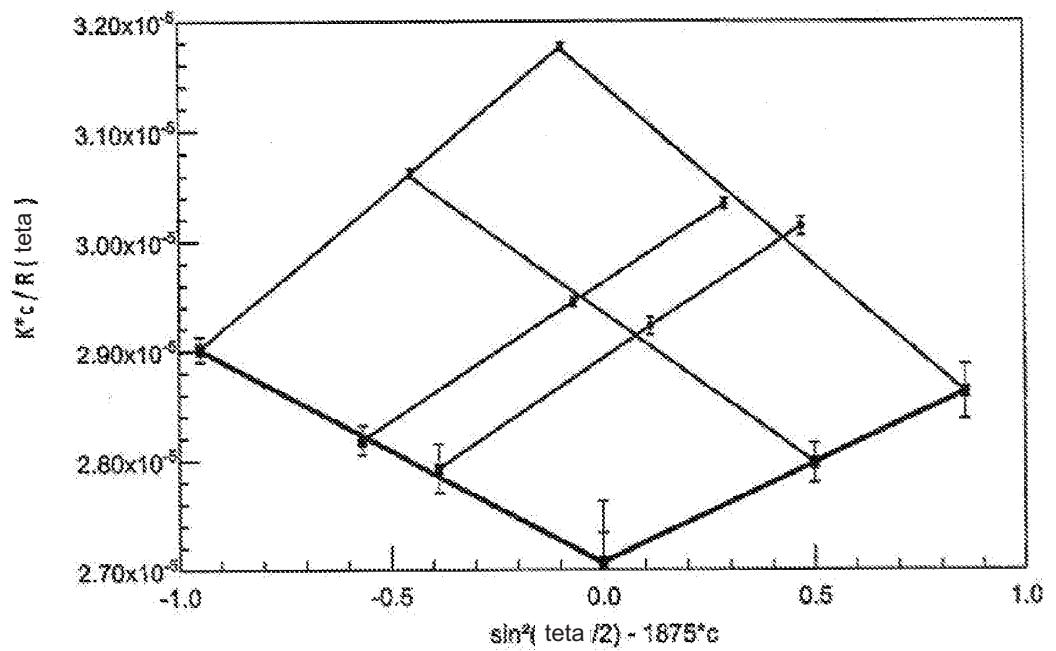
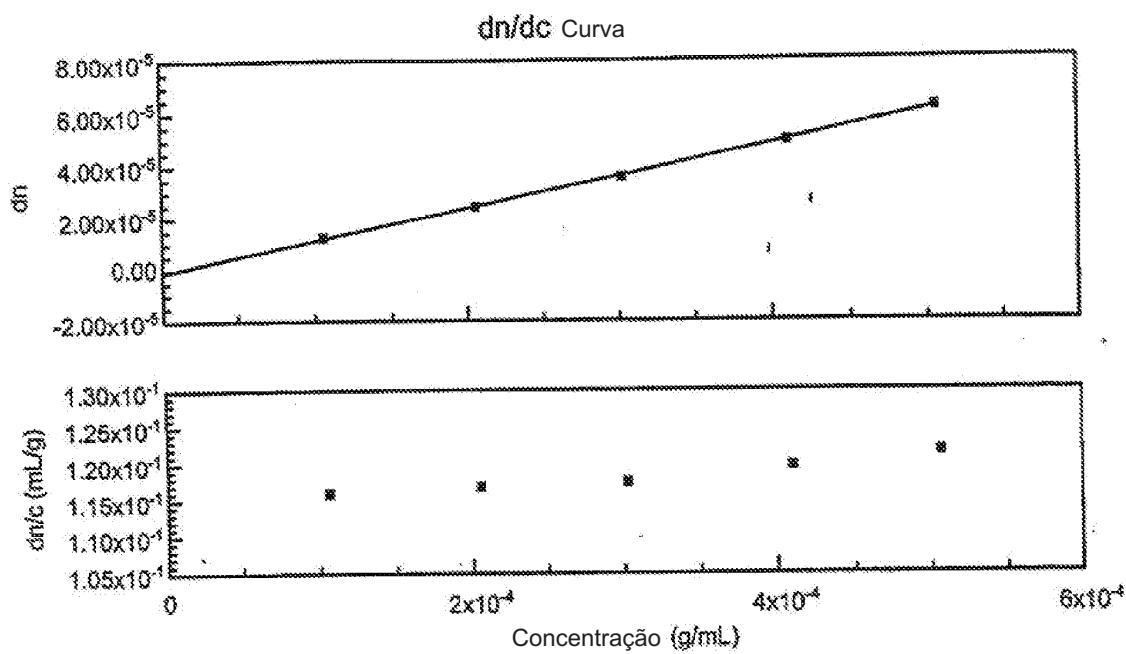


FIG. 3a



| Número de estudo | Amostra ID | Resultados (Daltons) |
|------------------|-------------------|----------------------|
| 3098-003 | Composto G | 36,950 [STD 8%] |

FIG. 3b

| Padrão | Tempo de retenção [min] | Peso molecular (g/mol) | LOG(10) |
|--------|-------------------------|------------------------|---------|
| A | 8.588 | 5900 | 3.77 |
| B | 8.328 | 11800 | 4.07 |
| C | 8.087 | 22600 | 4.36 |
| Z | 7.895 | 47300 | 4.67 |
| 8z | 7.614 | 112000 | 5.05 |
| C | 7.406 | 212000 | 5.33 |

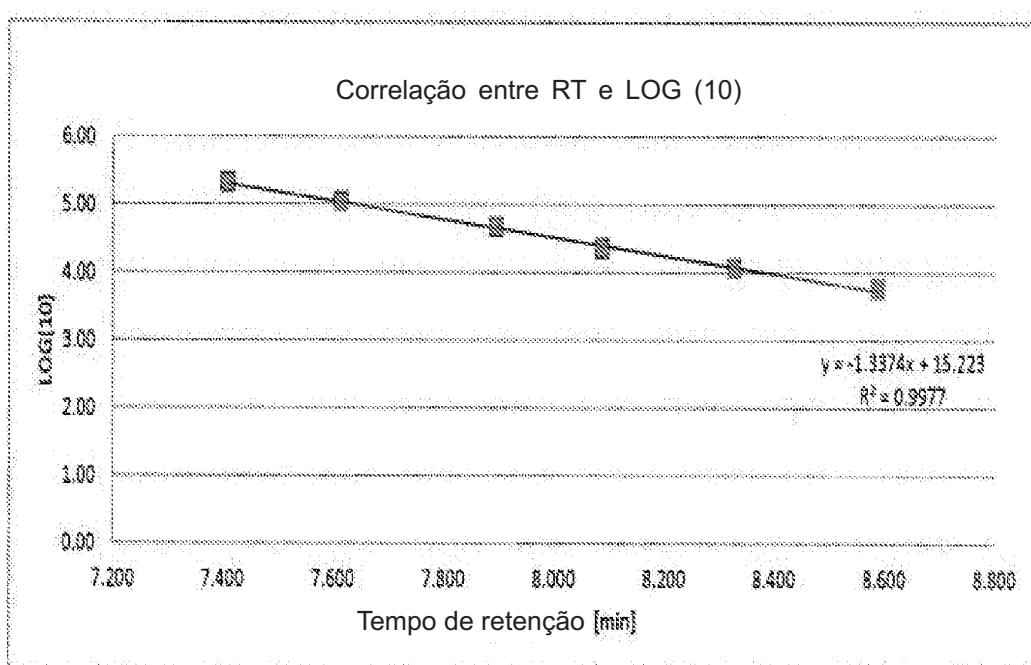
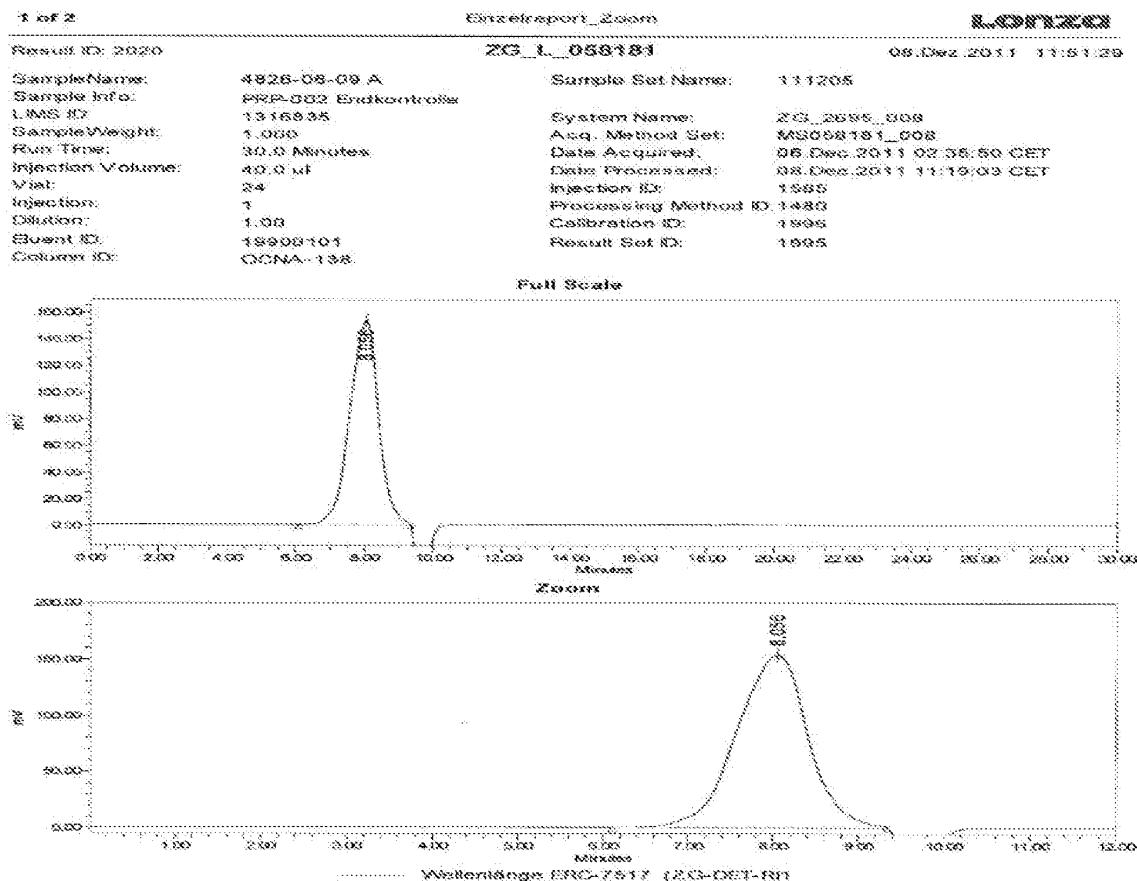


FIG. 4a

7/27



Resultados :

| Amostra ID | RT | Área | % de área | Faixa de MW (Daltons) |
|------------|-------|---------|-----------|-----------------------|
| 4828-06-09 | 8.056 | 8906130 | 100% | 20 K – 70 K |

FIG. 4b

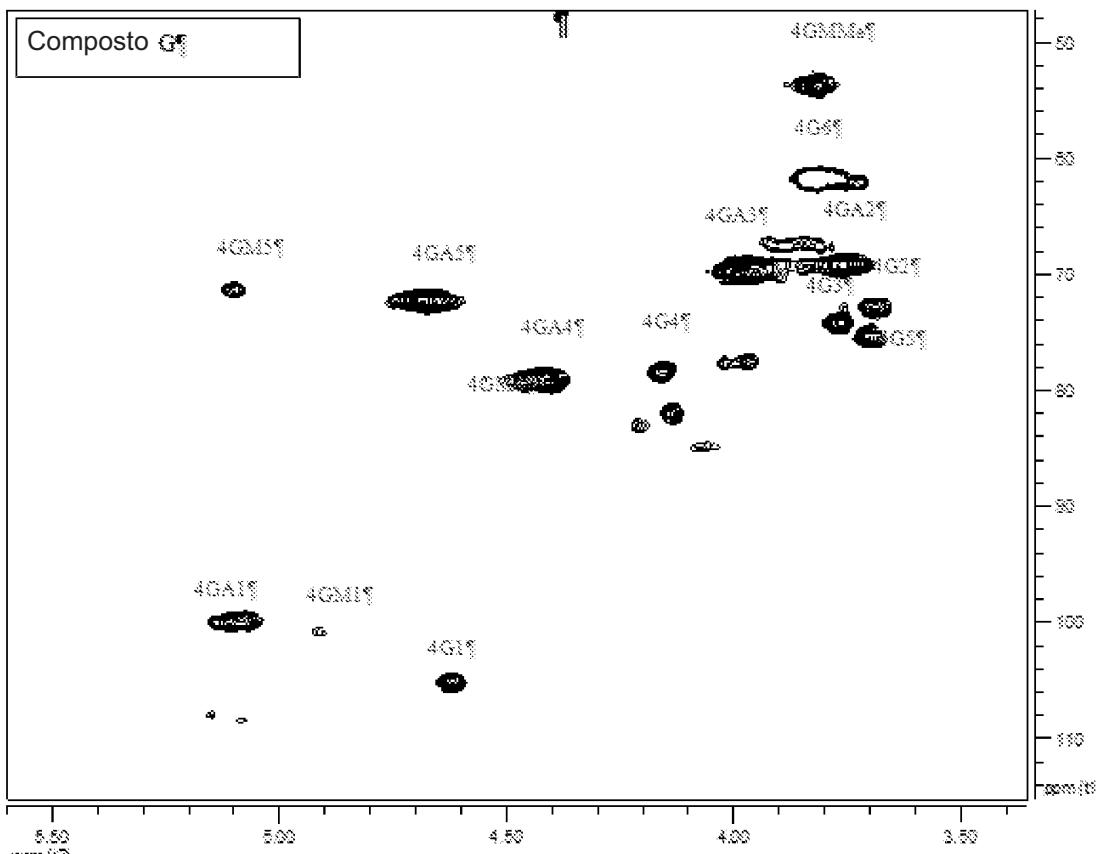


FIG. 5a

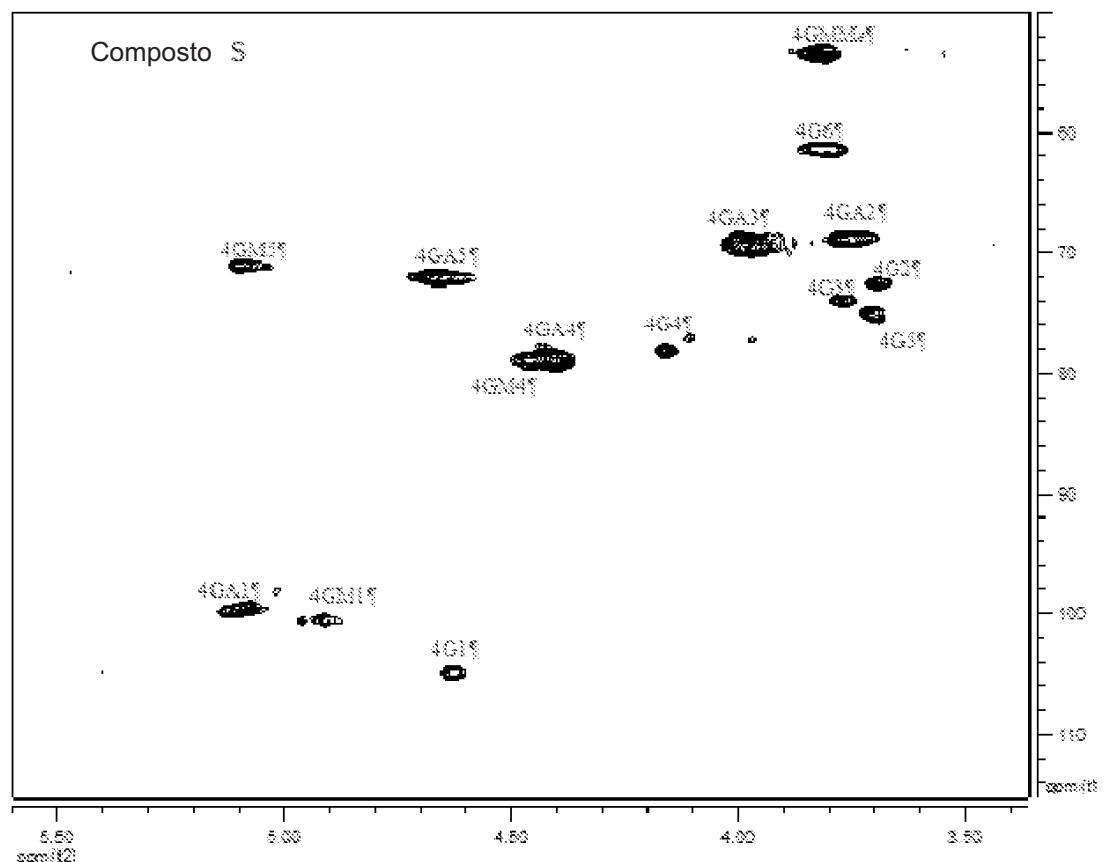


FIG. 5b

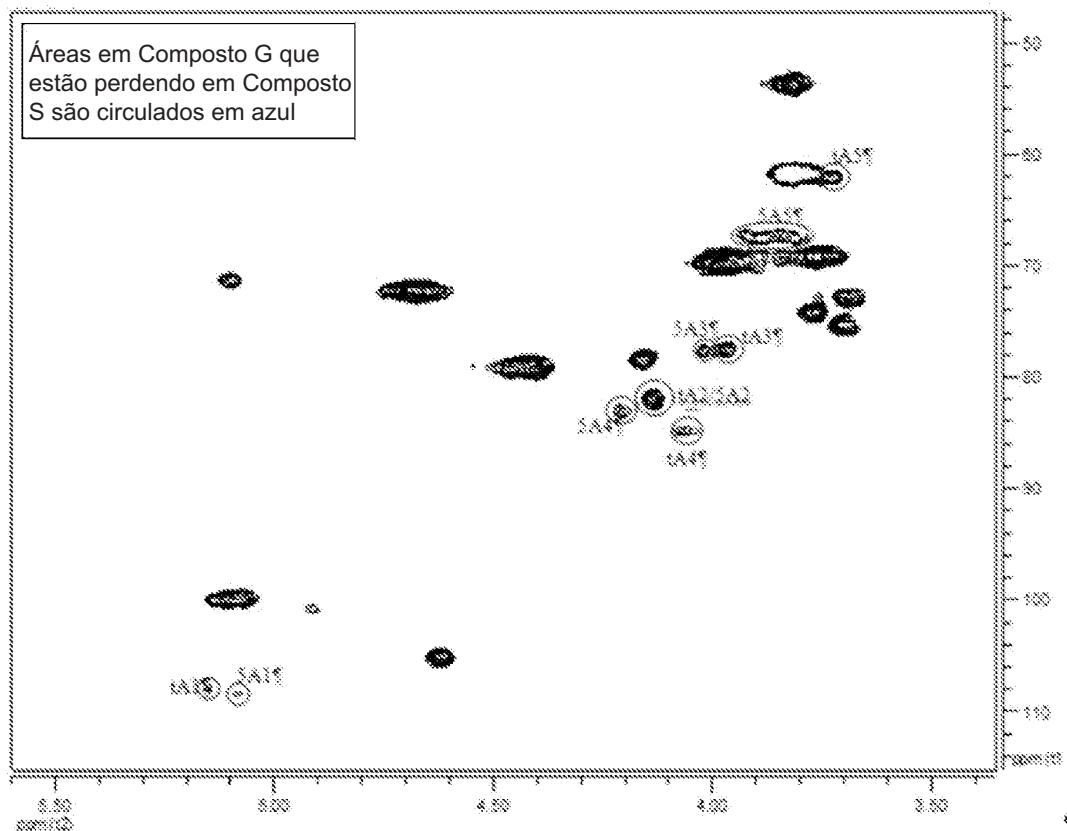


FIG. 5c

Proliferação de célula 3H timidina am 1 mg/ml – 48 horas

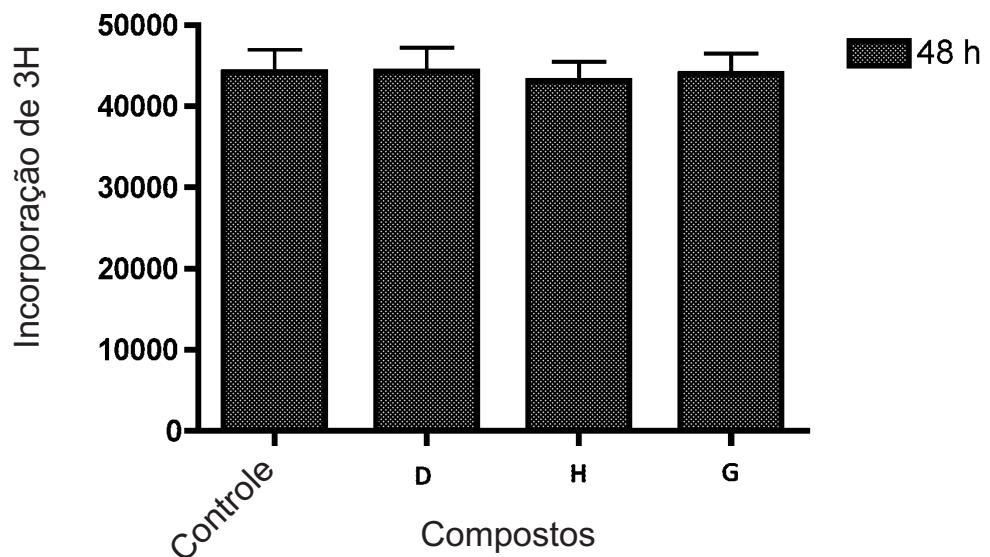


FIG. 6a

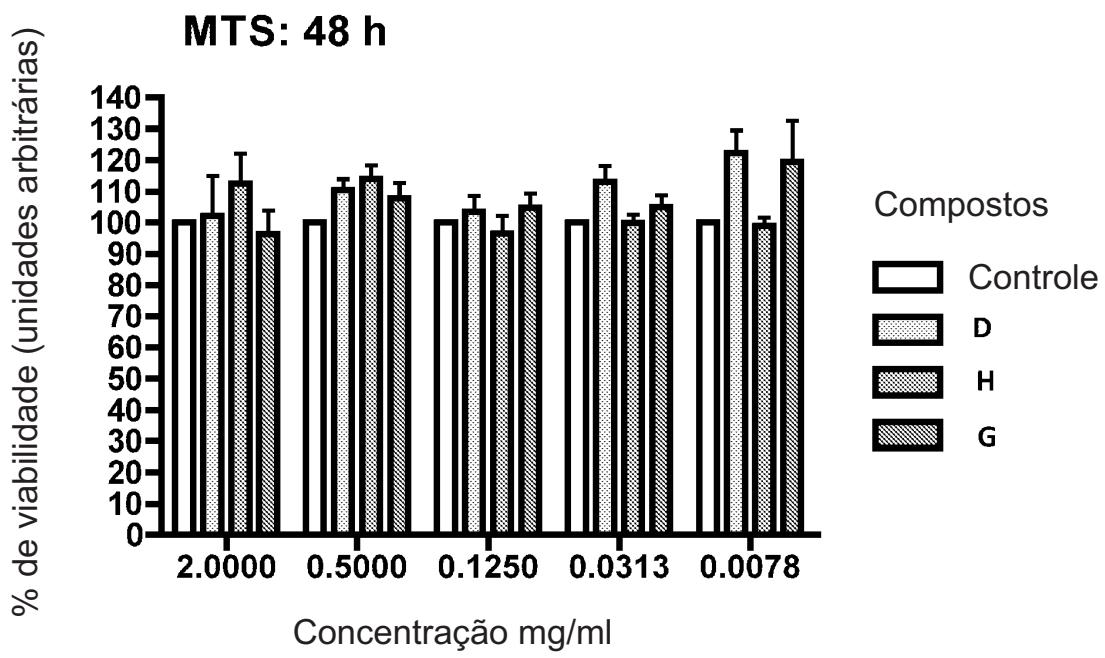


FIG. 6b

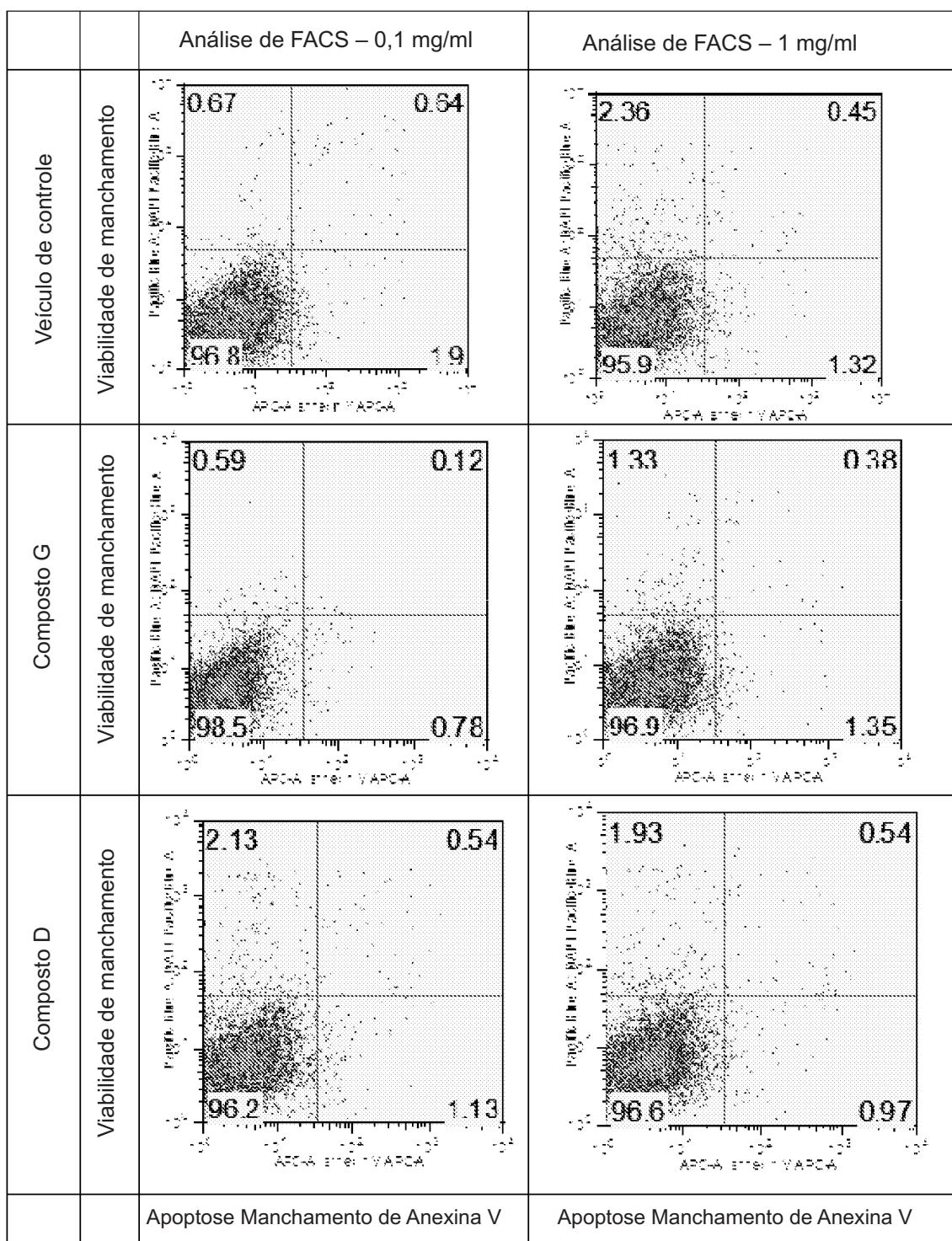


FIG. 6c

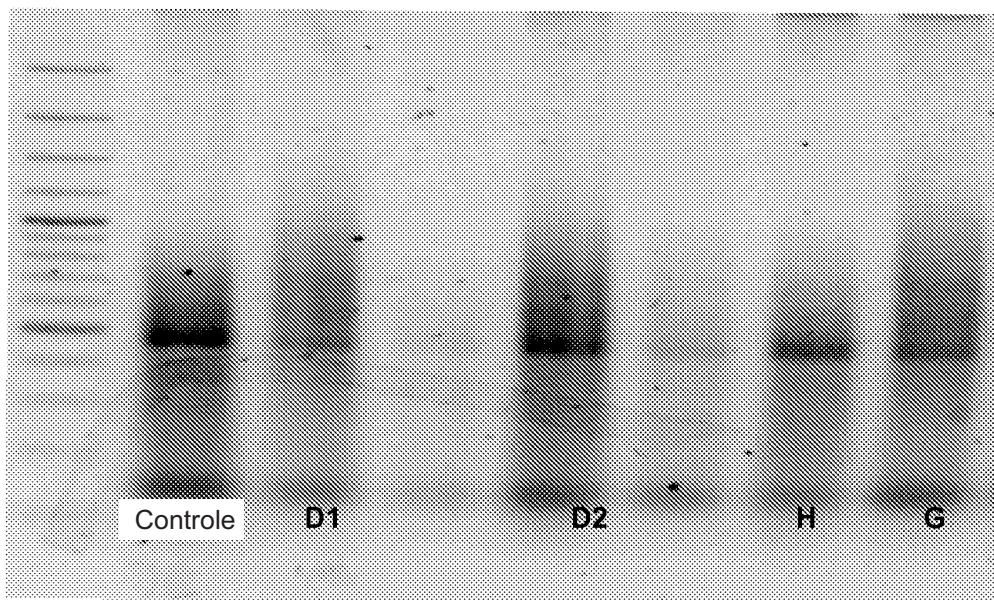


FIG. 6d

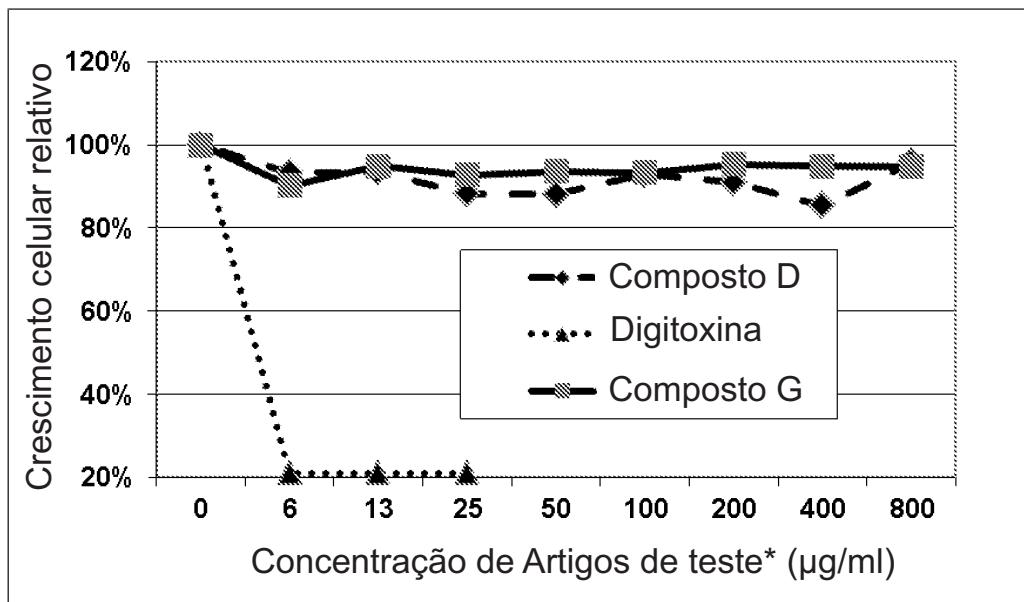


FIG. 7

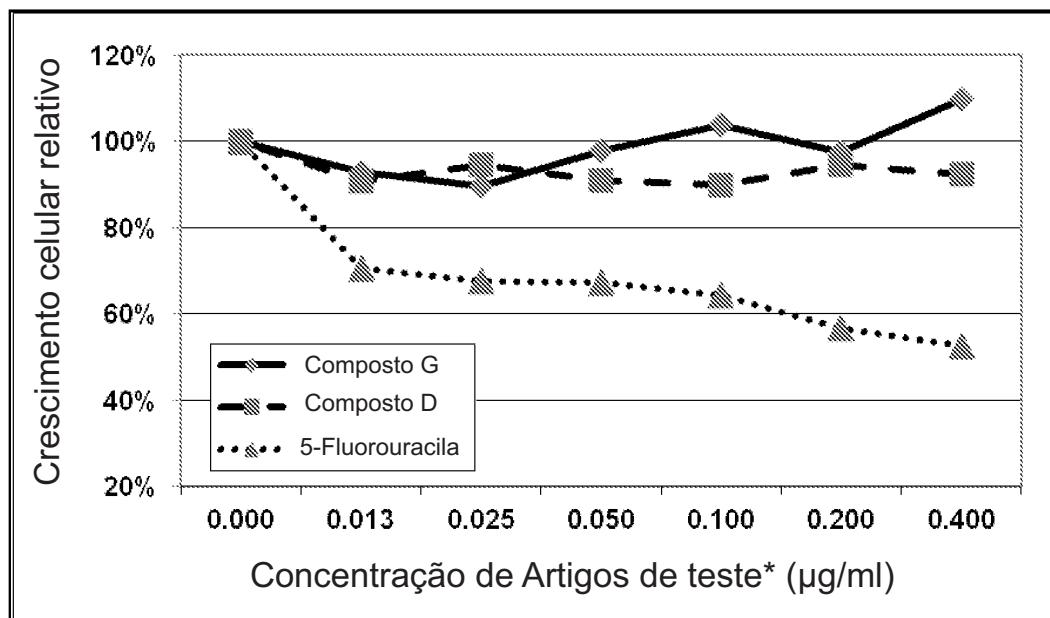


FIG. 8

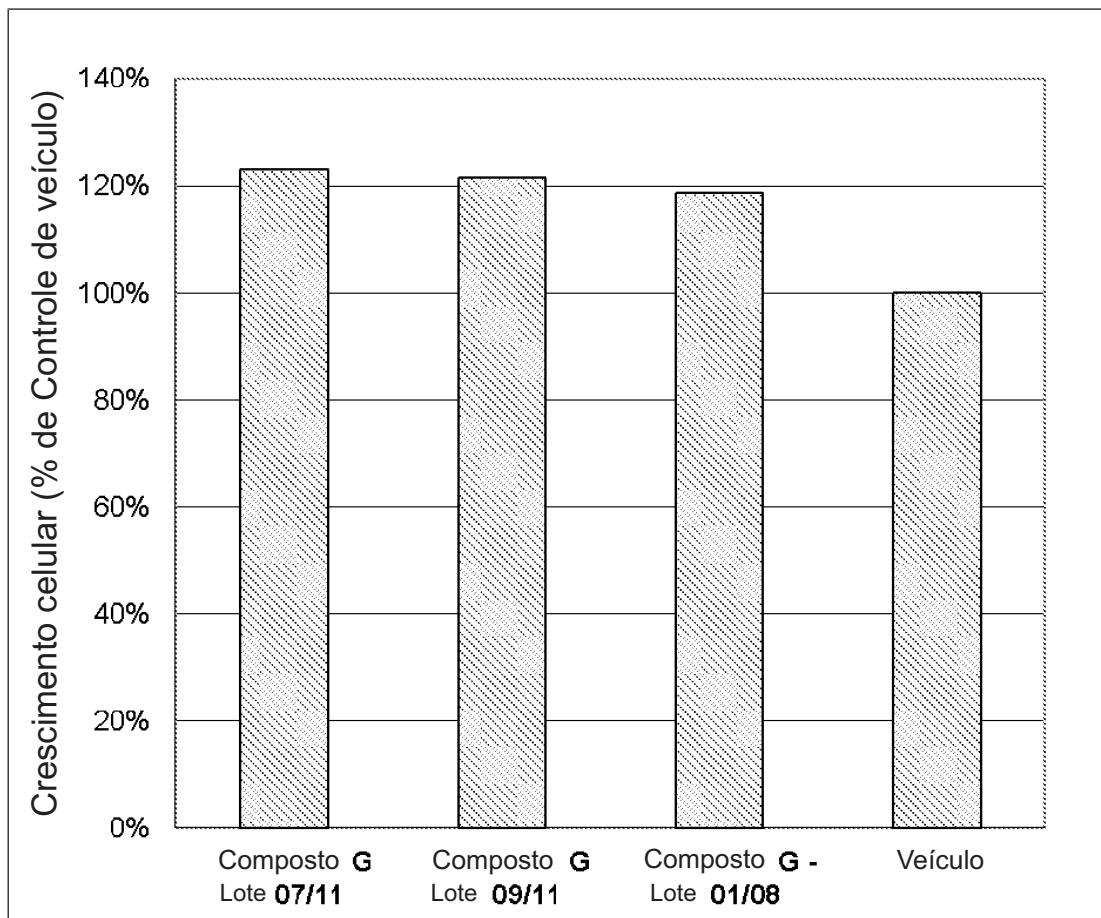


FIG. 9

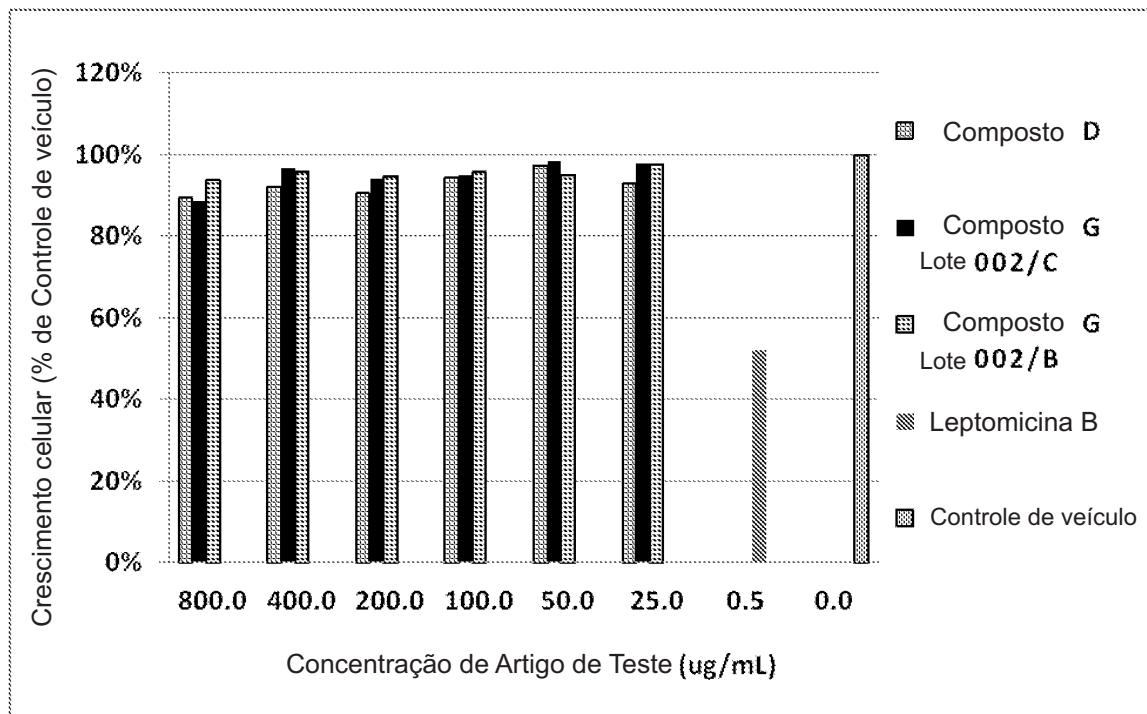


FIG. 10

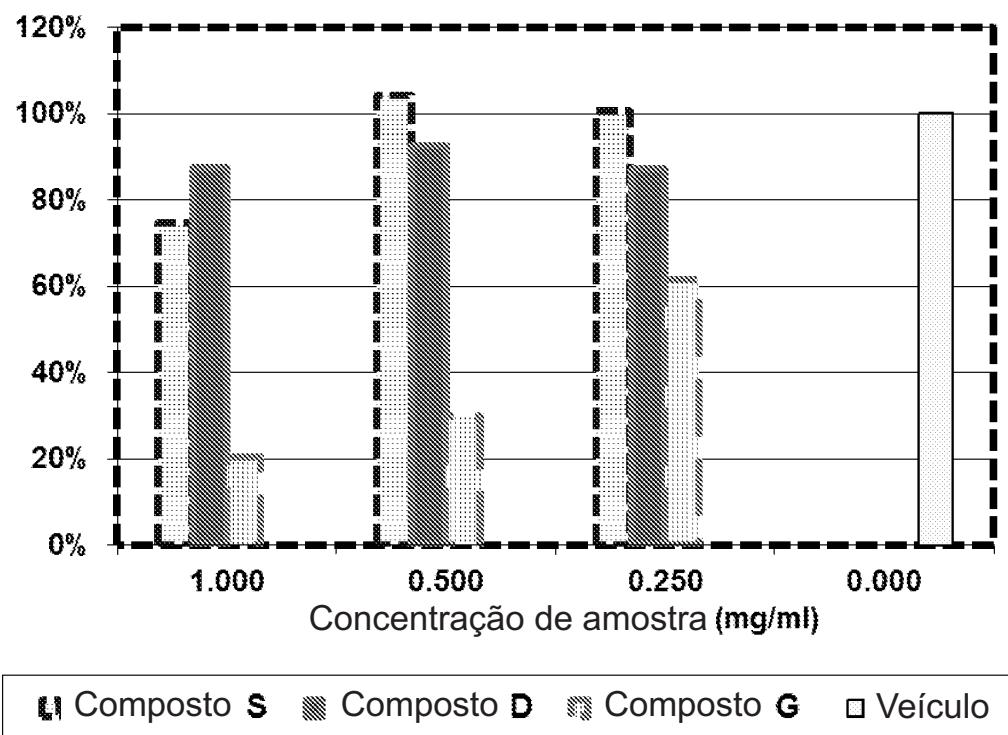


FIG. 11

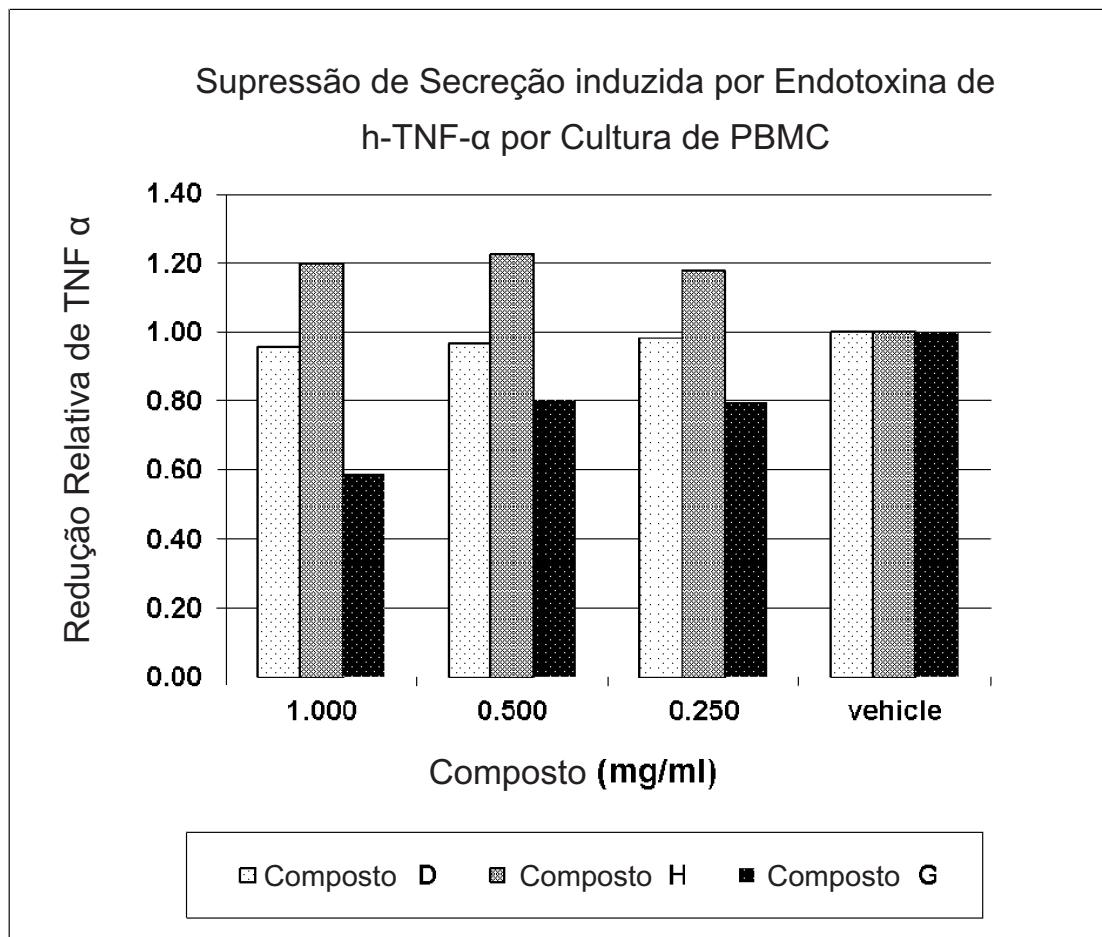


FIG. 12

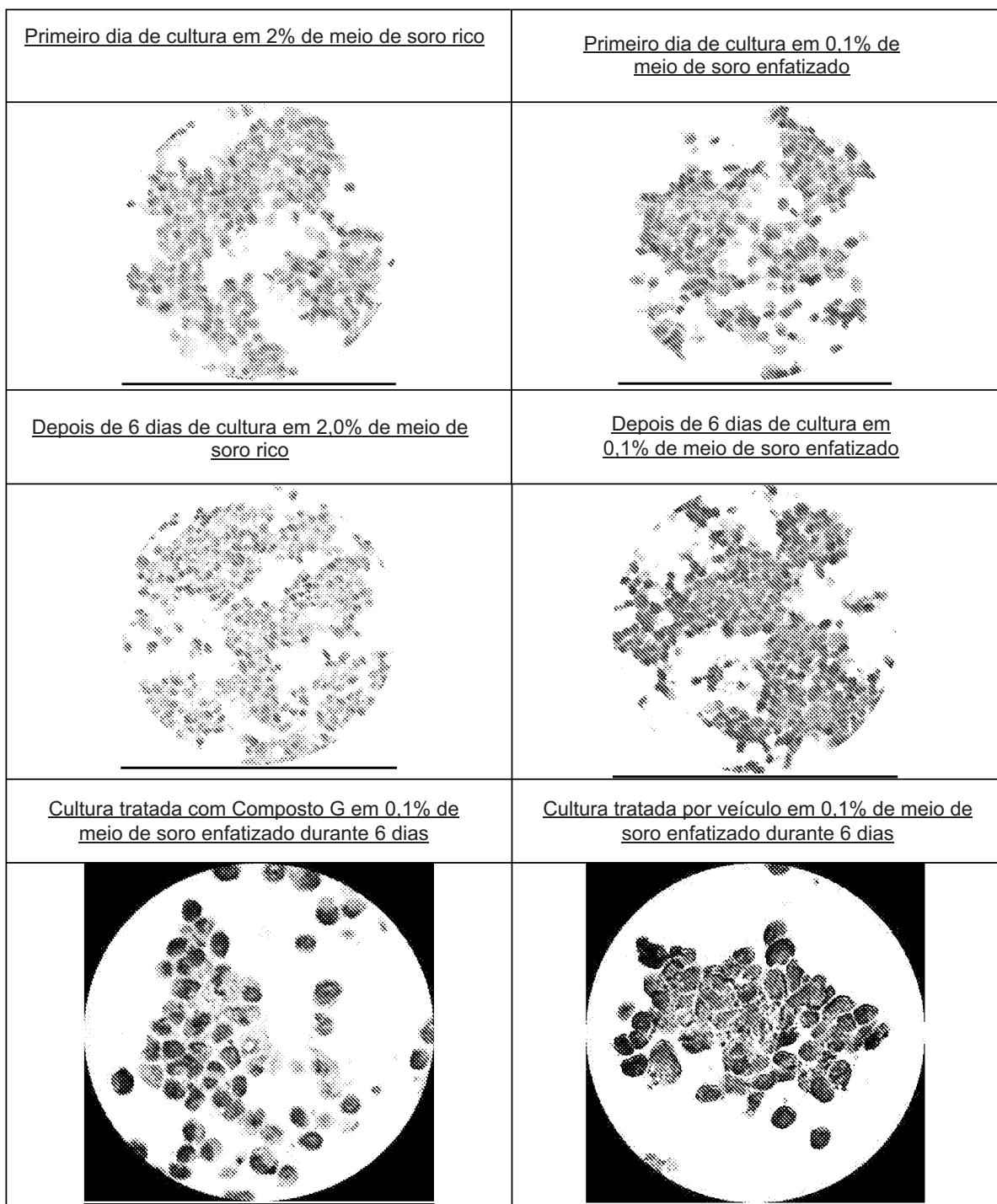


FIG. 13

Fibrose induzida por tioacetamida em Ratos

TAA 150mg/kg 3x/wk (11 semanas)

4 semanas Rx Todos determinados intra-peritonealmente

0.9% NaCl (volume similar 2X/ semanas)

Composto G (90 mg/kg 1X/ semanas)

Composto D (180 mg/kg 1X/semanas)

FIG. 14

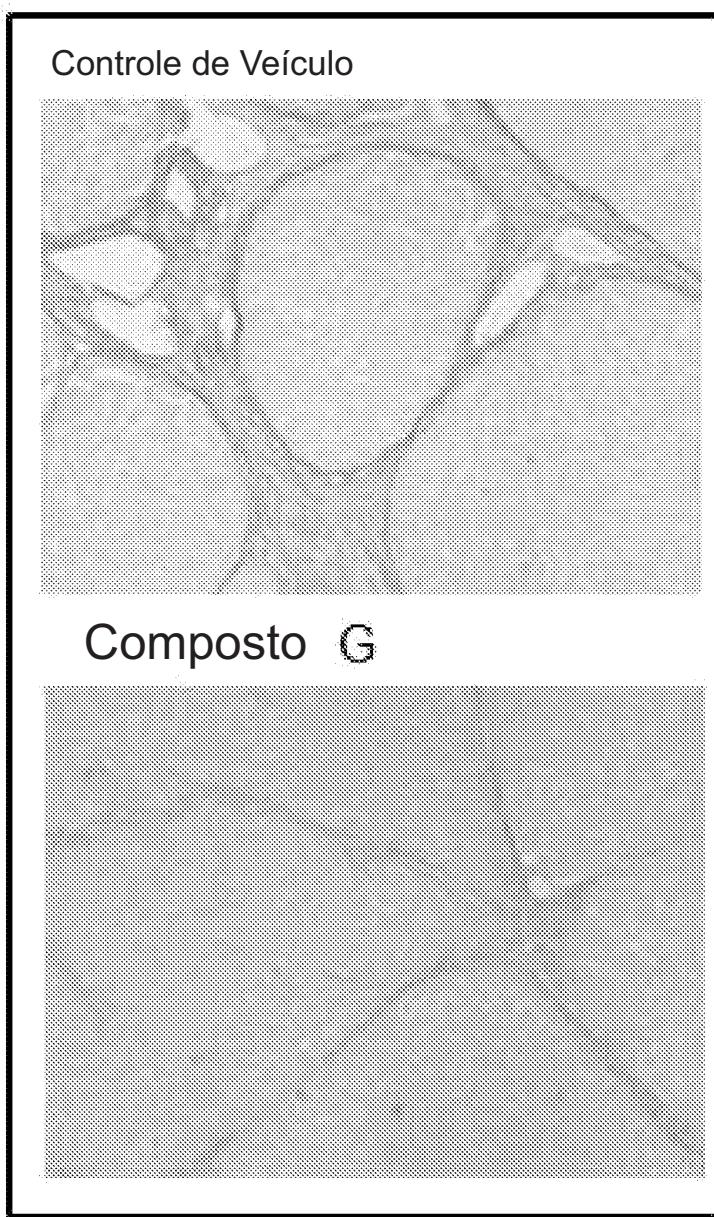
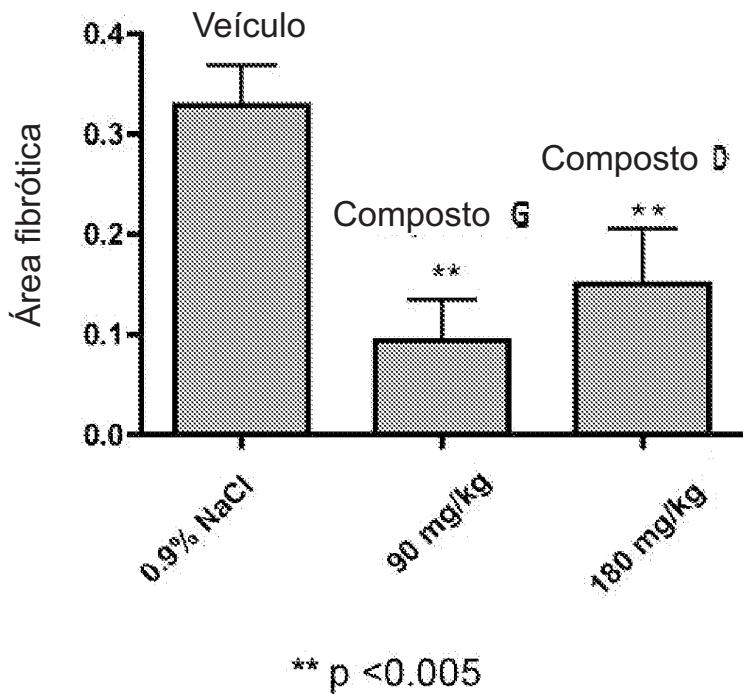


FIG. 15

Fibrose do fígado de quantificação de colágeno



** p < 0.005

FIG. 16

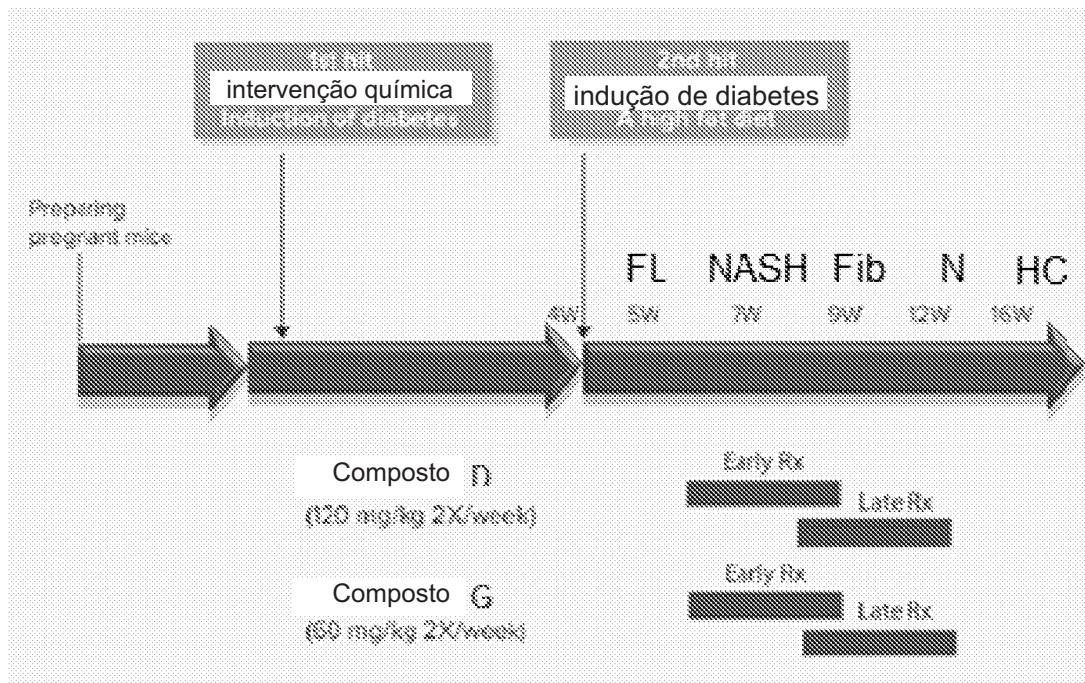


FIG. 17

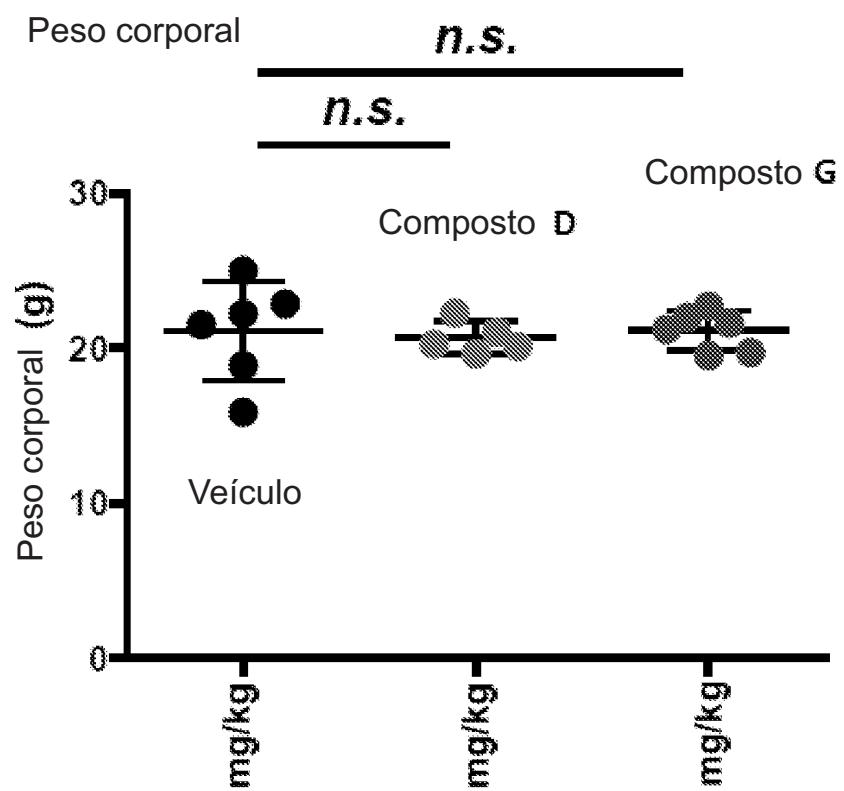
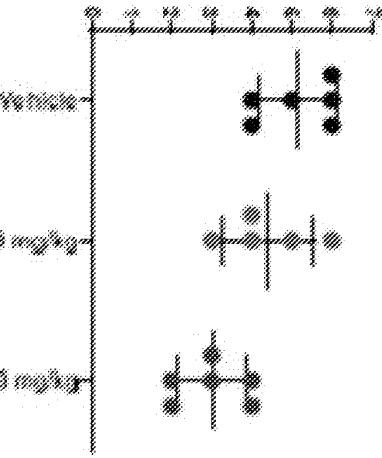


FIG. 18

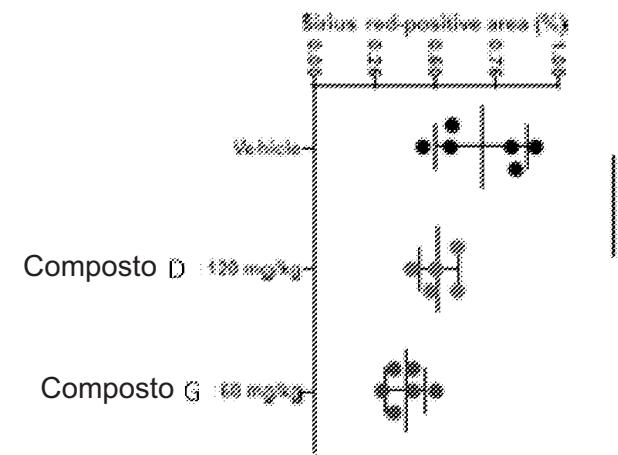
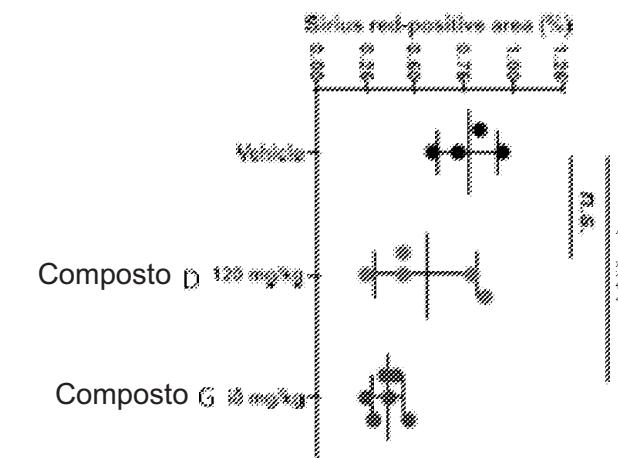
A.

Precoce Rx (6-9 wk)**Tarde Rx (9-12 wk)**

Marcação de atividade



A.

Precoco Rx (6-9 wk)**Tarde Rx (9-12 wk)**

B.

FIG. 20