

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 913**

51 Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/4525 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2017** **PCT/US2017/065270**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2018** **WO18107004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2017** **E 17879038 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023** **EP 3551629**

54 Título: **Oxabicicloheptanos para modulación de la respuesta inmunitaria**

30 Prioridad:

08.12.2016 US 201662497949 P

28.02.2017 US 201762465001 P

14.08.2017 US 201762545373 P

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

31.05.2024

73 Titular/es:

LIXTE BIOTECHNOLOGY, INC. (50.0%)

680 E. Colorado Blvd., Suite 180

Pasadena, CA 91101, US y

THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE

SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND

HUMAN SERVICES (50.0%)

72 Inventor/es:

KOVACH, JOHN S.;

ZHUANG, ZHENGPING;

HO, SZE CHUN WINSON;

WANG, HERUI y

LU, RONGZE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 970 913 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Oxabicicloheptanos para modulación de la respuesta inmunitaria

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos número de serie 62/497,949, presentada el 8 de diciembre de 2016, la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos número de serie 62/465,001, presentada el 28 de febrero de 2017 y la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos número de serie 62/545,373, presentada el 14 de agosto de 2017.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es una serina/treonina fosfatasa ubicua que desfosforila numerosas proteínas de vías de respuesta tanto dependientes como independientes de ATM/ATR (Mumby, M. 2007). Se ha demostrado previamente que la inhibición farmacológica de PP2A sensibiliza las células cancerosas al daño de ADN mediado por radiación a través de la fosforilación de diversas proteínas de señalización, como p53, γH2AX, PLK1 y Akt, lo que resulta en la desregulación del ciclo celular, la inhibición de la reparación de ADN y la apoptosis (Wei, D. et al. 2013).

La cantaridina, el principal ingrediente activo del extracto de escarabajo de la ampolla (*Mylabris*), es un compuesto derivado de la medicina tradicional china que ha demostrado ser un potente inhibidor de PP2A (Efferth, T. et al. 2005). Aunque la cantaridina se ha utilizado anteriormente en el tratamiento de los hepatomas y ha demostrado eficacia contra líneas celulares de leucemia multirresistentes a drogas (Efferth, T. et al. 2002), su grave toxicidad limita su utilidad clínica. LB-100 es una molécula pequeña derivada de cantaridina con toxicidad significativamente menor. Estudios preclínicos han mostrado que LB-100 puede potenciar los efectos citotóxicos de temozolomida, doxorrubicina y la radioterapia contra glioblastoma (GBM), el feocromocitoma metastático y el cáncer de páncreas (Wei, D. et al. 2013; Lu, J. et al. 2009; Zhang, C. et al. 2010; Martiniova, L. et al. 2011). LB-100 se está sometiendo también a un estudio de fase 1 en combinación con docetaxel para el tratamiento de tumores sólidos (Chung, V. 2013).

Winson S. Ho et al divulgan, en ONCOTARGET, (2016), vol. 7(11), páginas 12447-12463: "la inhibición de PP2A con LB100 potencia la citotoxicidad de cisplatino y supera la resistencia a cisplatino en células de meduloblastoma". El documento US2015/045373A1 divulga oxabicicloheptanos y oxabicicloheptenos, su preparación y su uso. Andrew M. Intlekofer et al divulgan, en JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, (2013), vol. 94(1), páginas 25-39: "En el banquillo: razonamientos preclínicos del bloqueo de CTLA-4 y PD-1 como inmunoterapia del cáncer".

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con la reivindicación 1, la presente invención proporciona un inhibidor de PP2A para uso en un método de:

1. (I) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del inhibidor PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control, en donde las cantidades, cuando se toman conjuntamente, son efectivas para tratar al sujeto; o

2. (II) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer y recepción de un inhibidor de puntos de control que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor PP2A eficaz para potenciar el tratamiento en relación con el inhibidor de puntos de control por separado; o

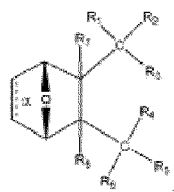
3. (III) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del inhibidor PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control, en donde las cantidades, cuando se toman conjuntamente, son efectivas para tratar el tumor o el cáncer; o

4. (IV) aumento de una respuesta de las células T a las células cancerosas en un sujeto afectado por el cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control eficaz para aumentar la respuesta de las células T a las células cancerosas; o

5. (V) aumento de la activación de las células T en un sujeto afectado por el cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control para aumentar de este modo la activación de las células T;

en donde el inhibidor de puntos de control es atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab; y

en donde el inhibidor de PP2A es un compuesto que tiene la estructura:



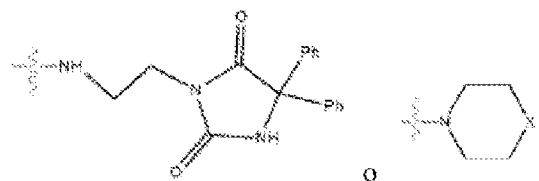
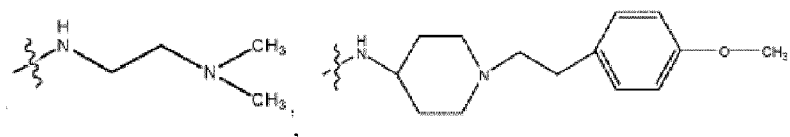
en donde

el enlace α está presente o ausente;

R_1 y R_2 son conjuntamente $=O$;

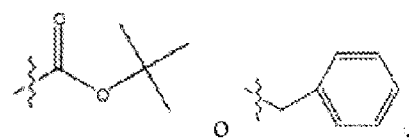
R_3 es OH , O^- o OR_9 , en donde R_9 es alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo;

R_4 es



donde X es O, S, NR_{10} , N^+HR_{10} o $N^+R_{10}R_{10}$,

donde cada R_{10} es independientemente H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo,



R_5 y R_6 tomados conjuntamente son $=O$;

R_7 y R_8 son cada uno H;

o una sal, zwitterión o éster del mismo.

Las características preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Mayor cambio en el tamaño de la lesión indicadora en pacientes con enfermedad mensurable en el momento del ingreso.

Figura 2. Duración de la estabilidad o respuesta parcial (círculo rojo) de la enfermedad (número de ciclos) para cada paciente en orden ascendente de entrada en el estudio.

Fig. 3A. La inhibición de PP2A potencia significativamente la producción de IFN- γ en células T CD4. Producción de IFN gamma a partir de células T CD4 activadas con perlas CD3/CD28 durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a 40nM. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 3B. La inhibición de PP2A potencia significativamente la producción de IFN- γ en células T CD4. Producción de IFN gamma a partir de células T CD4 activadas con perlas CD3/CD28 durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a diferentes concentraciones. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 4A. La inhibición de PP2A potencia significativamente la proliferación de células T CD4. Porcentaje de proliferación de células T CD4 con perlas CD3/CD28 durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a 1000nM. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 4B. La inhibición de PP2A potencia significativamente la proliferación de células T CD4. Porcentaje de proliferación de células T CD4 con perlas CD3/CD28 durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a diferentes concentraciones. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 5A. La inhibición de PP2A potencia significativamente la proliferación de células T CD4. Diagrama de flujo representativo de proliferación de células T CD4 con perlas CD3/CD28 durante 5 días en ausencia de LB-100. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 5B. La inhibición de PP2A potencia significativamente la proliferación de células T CD4. Diagrama de flujo representativo de proliferación de células T CD4 con perlas CD3/CD28 durante 5 días en presencia de LB-100 a 1000nM. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 6A. La inhibición de PP2A potencia significativamente la expresión de la molécula coestimuladora OX40 en células T. Porcentaje de células T CD4 que expresan OX40 con perlas CD3/CD28 durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a 1000nM. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 6B. La inhibición de PP2A potencia significativamente la expresión de la molécula coestimuladora OX40 en células T. Porcentaje de células T CD4 que expresan OX40 con perlas CD3/CD28 durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a diferentes concentraciones. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 7A. La inhibición de PP2A potencia Tbet, un factor de transcripción para impulsar la producción de IFN γ en células T CD4. Porcentaje de células T CD4 que expresan Tbet con perlas CD3/Cd28 durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a 1000nM. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 7B. La inhibición de PP2A potencia Tbet, un factor de transcripción para impulsar la producción de IFN γ en células T CD4. Porcentaje de proliferación de células T CD4 en cocultivo de células dendríticas derivadas de monocitos durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a diferentes concentraciones con o sin anticuerpo anti-PD1. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 8A. Proliferación potenciada de células T CD4 con tratamiento combinado. Porcentaje de proliferación de células T CD4 cocultivadas con células dendríticas derivadas de monocitos durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a 8 nM con o sin anticuerpo anti-PD1. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 8B. Proliferación potenciada de células T CD4 con tratamiento combinado. Porcentaje de proliferación de células T CD4 cocultivadas con células dendríticas derivadas de monocitos durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a diferentes concentraciones con o sin anticuerpo anti-PD1. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 9A. Diagrama representativo de citometría de flujo de la proliferación de células T CD4 en control.

Fig. 9B. Diagrama representativo de citometría de flujo de la proliferación de células T CD4 en LB-100.

Fig. 9C. Diagrama representativo de citometría de flujo de la proliferación de células T CD4 en anti-PD-1.

Fig. 9D. Diagrama representativo de citometría de flujo de la proliferación de células T CD4 en LB-100 + anti-PD-1.

Fig. 10A. Expresión de OX40 potenciada en células T CD4 con tratamiento combinado. Porcentaje de células T CD4 que expresan OX40 cocultivadas con células dendríticas derivadas de monocitos durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a 8 nM con o sin anticuerpo anti-PD1 a 0,05 nM. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 10B. Expresión de OX40 potenciada en células T CD4 con tratamiento combinado. Porcentaje de células T CD4 que expresan OX40 cocultivadas con células dendríticas derivadas de monocitos durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a diferentes concentraciones con o sin anticuerpo anti-PD1. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 11A. Expresión de Tbet potenciada en células T CD4 con tratamiento combinado. Porcentaje de células T CD4 que expresan Tbet cocultivadas con células dendríticas derivadas de monocitos durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a 200 nM con o sin anticuerpo anti-PD1. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Fig. 11B. Expresión de Tbet potenciada en células T CD4 con tratamiento combinado. Porcentaje de expresión de Tbet en células T CD4 cocultivadas con células dendríticas derivadas de monocitos durante 5 días en presencia o ausencia de LB-100 a diferentes concentraciones con o sin anticuerpo anti-PD1. Se añadió o se reemplazó LB-100 el 3^{er} día.

Figura 12. El inhibidor de PP2A redujo significativamente el crecimiento tumoral de melanoma B16 en ratones tratados cada dos días durante 8 dosis. El tratamiento se inició el mismo día de la implantación del tumor. Control - PBS, dosis baja - 0,16 mg/kg, dosis media - 0,32 mg/kg.

Fig. 13A. El inhibidor de PP2A aumentó las células efectoras CD4/8 en ratones sin tratamiento. El tratamiento in vivo con dosis bajas de LB indujo más células T efectoras CD8 (izquierda) y CD4 (derecha) en ganglios linfáticos. 5 ratones por grupo. Control - PBS, dosis baja - 0,16 mg/kg, dosis media - 0,32 mg/kg.

Fig. 13B. El inhibidor de PP2A aumentó las células efectoras CD4/8 en ratones sin tratamiento. Diagrama representativo de citometría de flujo de CD44+CD62L- CD8 (izquierda) y CD4 (derecha) en la Fig. 13A. Control - PBS, dosis baja - 0,16 mg/kg, dosis media - 0,32 mg/kg.

Fig. 14A. El inhibidor de PP2A redujo la expresión de PD-1 en células T CD8 en sangre y bazo. El tratamiento in vivo con dosis bajas de LB redujo las células T CD8+ que expresan PD-1 en sangre.

Fig. 14B. El inhibidor de PP2A redujo la expresión de PD-1 en células T CD8 en sangre y bazo. El tratamiento in vivo con dosis medias de LB redujo las células T CD8+ que expresan PD-1 en bazo.

Figura 15. El inhibidor de PP2A potenció la producción de IFN- γ a partir de células T humanas. Producción de IFN γ en el sobrenadante de células T CD4 cocultivadas con DC derivadas de monocitos en presencia de LB-100 o anti-PD-1 o una combinación (LB-100 y anti-PD-1).

Fig. 16A. El inhibidor de PP2A redujo la expresión de PD-1 en células T CD4 humanas. Porcentaje de células T CD4 que expresan PD-1 que se cocultivaron con DC derivadas de monocitos en presencia de control de isotipo.

Fig. 16B. El inhibidor de PP2A redujo la expresión de PD-1 en células T CD4 humanas. Porcentaje de células T CD4 que expresan PD-1 que se cocultivaron con DC derivadas de monocitos en presencia de LB-100.

Fig. 16C. El inhibidor de PP2A redujo la expresión de PD-1 en células T CD4 humanas. Porcentaje de células T CD4 que expresan PD-1 que se cocultivaron con DC derivadas de monocitos en presencia de anti-PD-1.

Fig. 16D. El inhibidor de PP2A redujo la expresión de PD-1 en células T CD4 humanas. Porcentaje de células T CD4 que expresan PD-1 que se cocultivaron con DC derivadas de monocitos en presencia de la combinación (LB-100 y anti-PD-1).

Fig. 17A. Las células T efectoras CD8+CD44+ aumentan con el tratamiento con inhibidor de PP2A LB-100. Porcentaje de población de células T efectoras CD8+CD44+ en los ganglios linfáticos drenadores tumorales de ratones portadores de tumores B16 tratados con LB-100 o PBS. 5 ratones por grupo.

Fig. 17B. Las células T efectoras CD8+CD44+ aumentan con el tratamiento con inhibidor de PP2A LB-100. Diagrama representativo de citometría de flujo de datos que se muestran en la Fig. 17A.

Fig. 18A. Aumento de células T efectoras CD44+CD62L- CD4 en los ganglios linfáticos de ratones portadores de tumores B16. Porcentaje de población de células T efectoras CD44+CD62L- CD4 en los ganglios linfáticos de ratones portadores de tumores B16 tratados con LB-100 o PBS. 5 ratones por grupo.

Fig. 18B. Aumento de células T efectoras CD44+CD62L- CD4 en los ganglios linfáticos de ratones portadores de tumores B16. Diagrama representativo de citometría de flujo de datos que se muestran en la Fig. 18A.

Fig. 19A. Aumento de células T efectoras CD44+CD62L- CD8 en los ganglios linfáticos de ratones portadores de tumores B16. Porcentaje de población de células T efectoras CD44+CD62L- CD8 en los ganglios linfáticos de ratones portadores de tumores B16 tratados con LB-100 o PBS. 5 ratones por grupo.

Fig. 19B. Aumento de células T efectoras CD44+CD62L- CD8 en los ganglios linfáticos de ratones portadores de tumores B16. Diagrama representativo de citometría de flujo de datos que se muestran en la Fig. 19A.

Fig. 20A. A los ratones BALB/c se implantaron células CT26 en su flanco torácico derecho por vía subcutánea. Después de 13 días, los ratones con tumores que alcanzaban un tamaño de 30-100 mm³ se aleatorizaron y trataron con control de PBS, anti-PD-L1, LB-100 o una combinación (LB-100 y anti-PD-1) durante 28 días. Volumen tumoral individual a lo largo del tiempo.

Fig. 20B. A los ratones BALB/c se implantaron células CT26 en su flanco torácico derecho por vía subcutánea. Después de 13 días, los ratones con tumores que alcanzaban un tamaño de 30-100 mm³ se aleatorizaron y trataron con control de PBS, anti-PD-L1, LB-100 o una combinación (LB-100 y anti-PD-1) durante 28 días. Mediana de volumen tumoral a lo largo del tiempo.

Fig. 20C. A los ratones BALB/c se implantaron células CT26 en su flanco torácico derecho por vía subcutánea. Después de 13 días, los ratones con tumores que alcanzaban un tamaño de 30-100 mm³ se aleatorizaron y trataron con control de PBS, anti-PD-L1, LB-100 o una combinación (LB-100 y anti-PD-1) durante 28 días. Supervivencia del ratón a lo largo del tiempo.

Fig. 21A. Aproximadamente 60 días después de la inoculación inicial, los ratones curados y los ratones de control no tratados con CT26 se (re)inocularon con células CT26 en sus flancos izquierdos. Volúmenes tumorales individuales a lo largo del tiempo.

Fig. 21B. Aproximadamente 60 días después de la inoculación inicial, los ratones curados y los ratones de control no tratados con CT26 se (re)inocularon con células CT26 en sus flancos izquierdos. Volúmenes tumorales medios a lo largo del tiempo.

Fig. 22A. A los ratones BALB/c se implantaron células CT26 en su flanco torácico derecho por vía subcutánea. Después de 11 días, los ratones con tumores que alcanzaban un tamaño de 30-100 mm³ se aleatorizaron en cuatro grupos: control, depleción de CD8, depleción de CD8 + combinación (LB-100 y anti-PD-1) o solo combinación (LB-100 y anti-PD-1). Se administraron anticuerpos depletantes de CD8 a los ratones del grupo de depleción. Dos días después, los ratones comenzaron el respectivo tratamiento. Volumen tumoral individual a lo largo del tiempo.

Fig. 22B. A los ratones BALB/c se implantaron células CT26 en su flanco torácico derecho por vía subcutánea. Después de 11 días, los ratones con tumores que alcanzaban un tamaño de 30-100 mm³ se aleatorizaron en cuatro grupos: control, depleción de CD8, depleción de CD8 + combinación (LB-100 y anti-PD-1) o solo combinación (LB-100 y anti-PD-1). Se administraron anticuerpos depletantes de CD8 a los ratones del grupo de depleción. Dos días después, los ratones comenzaron el respectivo tratamiento. Mediana de volumen tumoral a lo largo del tiempo.

Fig. 22C. A los ratones BALB/c se implantaron células CT26 en su flanco torácico derecho por vía subcutánea. Después de 11 días, los ratones con tumores que alcanzaban un tamaño de 30-100 mm³ se aleatorizaron en cuatro grupos: control, depleción de CD8, depleción de CD8 + combinación (LB-100 y anti-PD-1) o solo combinación (LB-100 y anti-PD-1). Se administraron anticuerpos depletantes de CD8 a los ratones del grupo de depleción. Dos días después, los ratones comenzaron el respectivo tratamiento. Supervivencia del ratón a lo largo del tiempo.

Fig. 23A. Los ratones BALB/C fueron inoculados por vía subcutánea con células tumorales CT26 en los flancos torácicos derechos y tratados con control (PBS), LB-100, anti-PD-1 o una combinación (LB-100 y anti-PD-1), como se describe en las Figs. 22A-C. Las células T infiltrantes tumorales se analizaron mediante citometría de flujo 12 días después del inicio del tratamiento. El porcentaje de células T CD8+ infiltrantes tumorales que producen IFN γ después de 4 horas de estimulación con PMA aumentó en el grupo combinado (* p = 0.05).

Fig. 23B. Los ratones BALB/C fueron inoculados por vía subcutánea con células tumorales CT26 en los flancos torácicos derechos y tratados con control (PBS), LB-100, anti-PD-1 o una combinación (LB-100 y anti-PD-1), como se describe en las Figs. 22A-C. Las células T infiltrantes tumorales se analizaron mediante citometría de flujo 12 días después del inicio del tratamiento. El porcentaje de células CD4+FoxP3 + reguladoras T de células CD45+ en el tumor disminuyó en el grupo de tratamiento con LB-100 (** p<0.01).

Fig. 24A. Los ratones BALB/c se inocularon con $0,5 \times 10^6$ células CT26 en el flanco torácico derecho. Cuando los tumores alcanzaron entre 50-100 mm³, los ratones se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento y se trataron cada 2 días durante 4 semanas.

Fig. 24B. A la izquierda, curvas de crecimiento tumoral individual: control, LB-100, a-PD-1 y una combinación. En el centro, tamaño medio del tumor a lo largo del tiempo. A la derecha, supervivencia acumulativa a lo largo del tiempo.

Fig. 24C. La eficacia de la inhibición de PP2A con bloqueo de PD-1 depende de las células T CD8+. Los ratones BALB/c se inocularon como en 24A. Cuando los tumores alcanzaron 30-100 mm³, los ratones se depletaron temporalmente de células T CD8+ y se trataron con una combinación.

Fig. 24D. A la izquierda, curvas de crecimiento tumoral individual: control, combinación, solo depleción de CD-8 y combinación con depleción de CD8. En el centro, tamaño medio del tumor a lo largo del tiempo. A la derecha, supervivencia acumulativa a lo largo del tiempo. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes. *P < 0,05, **P < 0,01 y ****P < 0,0001 (prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox).

Fig. 25A. Los ratones BALB/c se inocularon con $0,5 \times 10^6$ células CT26 por vía subcutánea y se trataron. Los ratones CR o de control sin tratamiento se expusieron de nuevo a pruebas durante 60 días después de la implantación inicial con $0,5 \times 10^6$ células CT26 en el flanco torácico izquierdo o en combinación con $1,25 \times 10^5$ células de carcinoma de mama 4T1 en la almohadilla de grasa mamaria. Los ratones sometidos (de nuevo) a pruebas con CT26 por separado no mostraron crecimiento de tumores CT 26.

Fig. 25B. A la izquierda, curvas de crecimiento tumoral individual: sin tratamiento, CR. A la derecha, tamaño medio del tumor a lo largo del tiempo.

Fig. 25C. Cuantificación del volumen tumoral de CT26 18 días después de la inoculación. (P<0,001, prueba t de Student de dos colas).

Fig. 25D. Los ratones CR y sin tratamiento se sometieron (de nuevo) a pruebas con células tumorales CT26 y 4T1: sin tratamiento - CT26, CR - CT26, sin tratamiento - 4T1, CR - 4T1. A la izquierda, curvas de crecimiento tumoral individual. A la derecha, tamaño medio del tumor a lo largo del tiempo.

Fig. 25E. Cuantificación del volumen tumoral de CT26 y 4T1 18 días después de la inoculación. (P<0,0001, ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey).

Fig. 25F. Imagen representativa de ratones sin tratamiento y CR después de la inoculación de tumores CT26 y 4T1.

Fig. 26A. Diagramas FACS representativos de CD44 y CD62L en células T CD8+ en el bazo.

Fig. 26B. Cuantificación de CD62-CD44+ (de células T CD8+) en el bazo (n=4-5).

Fig. 26C. Cuantificación de CD62-CD44+ (de células T CD8+) en ganglios linfáticos drenadores tumorales (n=4-5).

Fig. 26D. Diagramas FACS representativos de células T CD8+ CD3+ como porcentaje de células CD45+.

Fig. 26E. Análisis de infiltrado inmune de CD3+ expresado como porcentaje de células CD45+ (n=5). Las barras de error describen SEM. Los datos representan uno de dos experimentos con cinco ratones/grupo analizados de forma independiente.

Fig. 26F. Análisis de infiltrado inmune de CD8+ expresado como porcentaje de células CD45+ (n=5). Las barras de error describen SEM. Los datos representan uno de dos experimentos con cinco ratones/grupo analizados de forma independiente.

Fig. 26G. Análisis de infiltrado inmune de CD4+ expresado como porcentaje de células CD45+ (n=5). Las barras de error describen SEM. Los datos representan uno de dos experimentos con cinco ratones/grupo analizados de forma independiente.

Fig. 26H. Relación de células CD8+ respecto a CD4+ en el tumor. Las barras de error describen SEM. Los datos representan uno de dos experimentos con cinco ratones/grupo analizados de forma independiente.

Fig. 26I. CD8+ y CD44+ expresados como porcentaje de células CD45+ en el tumor. Las barras de error describen SEM. Los datos representan uno de dos experimentos con cinco ratones/grupo analizados de forma independiente.

Fig. 26J. CD8+ y Ki67+ expresados como porcentaje de células CD45+ en el tumor. Las barras de error describen SEM. Los datos representan uno de dos experimentos con cinco ratones/grupo analizados de forma independiente.

Fig. 26K. Expresión de PD1+ en células CD8+ en el tumor. * P<0,05, (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey).

Fig. 26L. Expresión de células CD4+ en el tumor. * $P < 0,05$, (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey).

Fig. 27A. Diagramas FACS representativos de células T FoxP3 y CD4 en tumores. Fig. 27B. Porcentaje de células T CD4+FoxP3+ del total de células CD3+.

Fig. 27C. Relación de células Treg CD8+ respecto a CD4+FoxP3+ en el tumor (n= 5).

Fig. 27D. Diagramas FACS representativos de células T CD8+IFN γ + de células CD45+.

Fig. 27E. Porcentaje de células T CD8+IFN γ + de células CD45+.

Fig. 27F. Porcentaje de células T CD8+TNF α + de células CD45+.

Fig. 27G. Porcentaje de células T CD8+ doble positivos IFN γ +TNF α + T de células CD45+.

Fig. 27H. Porcentaje de células T CD8+GranzymeB+ de células CD45+.

Fig. 27I. Porcentaje de CD4+IFN γ + de células T CD4+.

Fig. 27J. Resumen de subconjuntos de células inmunitarias CD45+ y células CD45- determinado por FACS. Los subconjuntos se describen como porcentaje de todos los eventos en vivo adquiridos (derecha) y células CD3+ (izquierda); diagrama de la derecha: leucocitos no CD45-, CD3+, no CD3+ CD45; diagrama de la izquierda: Treg CD8, CD4, CD4-conv. * $P < 0,05$, (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey). Las barras de error describen SEM. Los datos representan uno de dos experimentos con cinco ratones/grupo analizados de forma independiente.

Fig. 28A. Análisis citométrico de flujo de marcadores de activación y puntos de control inmunitarios de (A) CD4+ en el bazo de ratones que reciben tratamiento con LB-100 y/o aPD-1. En células T CD4+, a diferencia de las células T CD8+, no hubo cambio en la expresión de CD62L-CD44+. Tampoco hubo cambio en la expresión de marcadores de puntos de control inmunitarios: PD1, CTLA4, TIM3 y OX40.

Fig. 28B. Análisis citométrico de flujo de marcadores de activación y puntos de control inmunitarios de células CD8+ en el bazo de ratones que reciben tratamiento con LB-100 y/o aPD-1. En las células T CD8+ no hubo en la expresión de marcadores de puntos de control inmunitarios: PD1, CTLA4, TIM3 y OX40.

Fig. 29A. Análisis citométrico de flujo de marcadores de activación y puntos de control inmunitarios de CD4+ en los ganglios linfáticos drenadores (dLN) de ratones que reciben tratamiento con LB-100 y/o aPD-1. En células T CD4+, a diferencia de las células T CD8+, no hubo cambio en la expresión de CD62L-CD44+. Hubo un aumento reducido, pero significativo, de la expresión de PD-1 en grupos tratados con aPD-1, pero LB-100 por separado o en combinación no alteró adicionalmente la expresión de PD-1. No hubo cambio en la expresión de marcadores de puntos de control inmunitarios: CTLA4, TIM3 y OX40. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey). Las barras de error describen SEM.

Fig. 29B. Análisis citométrico de flujo de marcadores de activación y puntos de control inmunitarios de linfocitos CD8+ en los ganglios linfáticos drenadores (dLN) de ratones que reciben tratamiento con LB-100 y/o aPD-1. En las células T CD8+ no hubo en la expresión de marcadores de puntos de control inmunitarios: PD1, CTLA4, TIM3 y OX40. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey). Las barras de error describen SEM.

Fig. 30. Estrategia de clasificación para el análisis citométrico de flujo de linfocitos infiltrantes tumorales. Se utilizó la puerta SSC-FSC para excluir los restos celulares, seguido de la exclusión de dupletes por la puerta FSC-H-FSA-A. Se utilizó tinción de vivos-muertos fijables (L/D) para excluir las células muertas. A continuación se clasificaron las células vivas en función de la expresión del marcador panleucocitario CD45+. las células CD45- se consideraron células tumorales. A continuación se fenotiparon células CD45+ en función de la expresión de CD3, CD8, CD4. Las células CD45+CD3+CD8+ se clasificaron como linfocitos CD8+, mientras que las células CD45+CD3+CD4+ se clasificaron como linfocitos CD4+. Además, se realizó la tinción de subconjuntos CD4+ y CD8+ como se indica en el texto.

Fig. 31A. Se mostraron las relaciones de células CD3+, CD8+ y CD4+ respecto a células residentes en el tumor CD45- para cada grupo de tratamiento. Hubo un aumento en las relaciones CD3/tumor y CD8/tumor en el grupo de combinación en comparación con el control, mientras que no hubo cambios en la relación CD4/tumor.

Fig. 31B. Se mostró el número de células CD3+ CD8+ y CD4+ por gramo de peso de tumor para cada grupo de tratamiento. Se observó una tendencia similar a la de la Fig. 31A, pero hubo diferencias significativas en

CD3+ y CD8+ por gramo de tumor en un grupo tratado con aPD-1 por separado en comparación con el control. Hubo una tendencia de aumento adicional en CD3+ y CD8+/tumor para el tratamiento combinado, pero no hubo significado estadístico. *P < 0,05, ***<P<0,001 (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey). Las barras de error describen SEM.

Fig. 32A. Análisis citométrico de flujo de marcadores de puntos de control inmunitarios de linfocitos CD4+ en tumores de ratones que reciben tratamiento con LB-100 y/o aPD-1. En las células T CD4+ no hubo en la expresión de marcadores de puntos de control inmunitarios: TIM3, OX40, CTLA4 y LAG3.

Fig. 32B. Análisis citométrico de flujo de marcadores de puntos de control inmunitarios de linfocitos CD8+ en tumores de ratones que reciben tratamiento con LB-100 y/o aPD-1. En las células T CD8+ no hubo en la expresión de marcadores de puntos de control inmunitarios: TIM3, OX40, CTLA4 y LAG3.

Fig. 33A. Diagrama representativo de citometría de flujo que muestra un aumento de TNF- α . El porcentaje mostrado es de CD3+ total.

Fig. 33B. Diagrama representativo de citometría de flujo que muestra un aumento de TNF- α IFN- γ doble positivo. El porcentaje mostrado es de CD8+ total.

Fig. 33C. Diagrama representativo de citometría de flujo que muestra un aumento de células T infiltrantes tumorales GranzymeB + CD8. El porcentaje mostrado es de células CD3+ totales.

Fig. 34A. Los ratones C57BL/6 se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento. Se inocularon $2,5 \times 10^5$ células B16F10 2 días después del inicio del tratamiento por vía subcutánea en el flanco torácico derecho. Los ratones se trataron cada dos días hasta el punto final de supervivencia.

Fig. 34B. A la izquierda, curvas de crecimiento tumoral individual: control, LB-100, α -PD-1 y una combinación. A la derecha, tamaño medio del tumor a lo largo del tiempo.

Fig. 34C. Cuantificación del volumen tumoral de B16 15 días después de la inoculación. (P<0,0001, ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey)

Fig. 34D. Supervivencia acumulativa a lo largo del tiempo. *P < 0,05, (prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox). Los datos se agrupan a partir de 2 experimentos independientes.

Fig. 34E. Imágenes representativas de tinción de hematoxilina y eosina de la piel y las glándulas salivales de cada grupo de tratamiento (n = 2-3 por grupo). Barras de escala, 100 μ m.

Fig. 35. Imágenes representativas de tinción de hematoxilina y eosina del páncreas, del pulmón y del estómago de cada grupo de tratamiento (n = 2-3 por grupo). Barras de escala, 100 μ m.

Fig. 36A. Se aislaron células CD3 T de esplenocitos de ratones y se cultivaron con o sin estimulación utilizando anti-CD3 inmovilizado (10 μ g/ml) y anti-CD28 soluble (2 μ g/ml). Se midió la actividad enzimática de PP2A después de 3 horas de activación. Se midió la actividad de PP2A en relación con el control activado en presencia de titración de dosis de LB-100.

Fig. 36B. Citometría de flujo que analiza AKT fosforilado en Thr308 (p-AKT(T308)) o Ser473 (p-AKT(S473)) después de 3 horas de estimulación en presencia de titración de dosis de LB-100.

Fig. 36C. Citometría de flujo que analiza S6 fosforilado (p-S6) en presencia de titración de dosis de LB-100. *P < 0,05, ***P<0,001 (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey). Los datos son representativos de un experimento de dos experimentos independientes con resultados similares. Las barras de error describen SEM.

Fig. 37. Señalización de AKT y mTORC después de 30 minutos de estimulación. Citometría de flujo que analiza AKT fosforilado en Thr308 (p-AKT(T308)), Ser473 (p-AKT(S473)) o S6 fosforilado (p-S6) después de 30 minutos de estimulación en presencia de titración de dosis de LB-100. (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey). Los datos son representativos de un experimento de dos experimentos independientes con resultados similares. Las barras de error describen SEM.

Fig. 38A. A la izquierda, el % de células CD4 positivas para Foxp3. A la derecha, datos representativos de citometría de flujo que demuestran la disminución en % de células Foxp3 con LB-100. Las células se clasificaron como células CD4+.

Fig. 38B. Se midieron los niveles intracelulares de GATA3 con citometría de flujo, A la izquierda, el % de células CD4 positivas para GATA3. A la derecha, datos representativos de citometría de flujo que demuestran la disminución en % de células GATA3 con LB-100.

Fig. 38C. Relación de GATA3+ Th2 sobre células Tbet+ Th1 CD4.

Fig. 38D. Se midió la producción intracelular de IFN- γ mediante citometría de flujo. A la izquierda, el % de células CD4 positivas para IFN- γ en condiciones T_H1 y T_H2 . A la derecha, datos representativos de citometría de flujo que muestran un aumento en el % de células IFN- γ con LB-100 en condiciones tanto T_H1 como T_H2 .

Fig. 38E. Producción de TNF, IL2 e IFN- γ en el sobrenadante de células T CD4⁺ sin tratamiento activadas en condiciones de sesgo T_H1 durante 3 días.

Fig. 38F. Producción de TNF, IL2, IFN- γ e IL4 en el sobrenadante de células T CD4⁺ sin tratamiento activadas en condiciones de sesgo T_H2 durante 3 días. Los niveles de citocina se ajustaron al número absoluto de células. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey). Los datos son representativos de un experimento de dos experimentos independientes con resultados similares. Las barras de error describen SEM.

Fig. 39A. Se indujeron DC a partir de monocitos purificados mediante cultivo en IL4 y GM-CSF durante 7 días. A continuación se cocultivaron 10⁵ células T CD4⁺ etiquetadas con CFSE purificadas con 10⁴ DC alógenicas en presencia de una titración de LB-100 por duplicado o triplicado durante 5 días. Se repuso LB-100 el día 3. Se recolectaron los sobrenadantes el día 5 y se midió la producción de IFN- γ . El análisis FACS se realizó en las células de cultivo.

Fig. 39B. Proliferación in vitro de células T CD4⁺ en presencia de titración de dosis de LB-100, medida mediante dilución de CFSE citosólica. A la izquierda, se representó gráficamente el % de células divididas frente a la concentración de LB-100. A la derecha, datos representativos de citometría de flujo que muestran un aumento en el % de células divididas a 1 μ M de LB-100.

Fig. 39C. Se midió la producción de IFN- α el día 5, mostrando un aumento dependiente de la dosis en la secreción de IFN- α con LB-100.

Fig. 39D. Se realizó la tinción intracelular de T-bet en células T CD4⁺ después de 5 días de cocultivo. Porcentaje de CD4⁺Tbet⁺ (de células CD4⁺) frente a la concentración de LB-100.

Fig. 39E. Producción de (E) IFN- γ en células tratadas con control de isotipo, LB-100 y/o Nivolumab, que demuestra una respuesta sinérgica al tratamiento combinado. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (ANOVA de un factor con la prueba de comparación múltiple de Tukey). Los datos son representativos de un experimento de dos experimentos independientes con resultados similares. Las barras de error describen SEM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

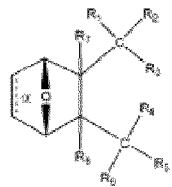
La presente invención proporciona un inhibidor de PP2A para uso en un método de:

1. (I) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del inhibidor PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control, en el que las cantidades, cuando se toman conjuntamente, son efectivas para tratar al sujeto; o
2. (II) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer y recepción de un inhibidor de puntos de control que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor PP2A eficaz para potenciar el tratamiento en relación con el inhibidor de puntos de control por separado; o
3. (III) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del inhibidor PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control, en donde las cantidades, cuando se toman conjuntamente, son efectivas para tratar el tumor o el cáncer; o
4. (IV) aumento de una respuesta de las células T a las células cancerosas en un sujeto afectado por el cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control eficaz para aumentar la respuesta de las células T a las células cancerosas; o
5. (V) aumento de la activación de las células T en un sujeto afectado por el cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control para aumentar de este modo la activación de las células T;

en donde el inhibidor de puntos de control es atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab; y

en donde el inhibidor de PP2A es un compuesto que tiene la estructura:

en donde



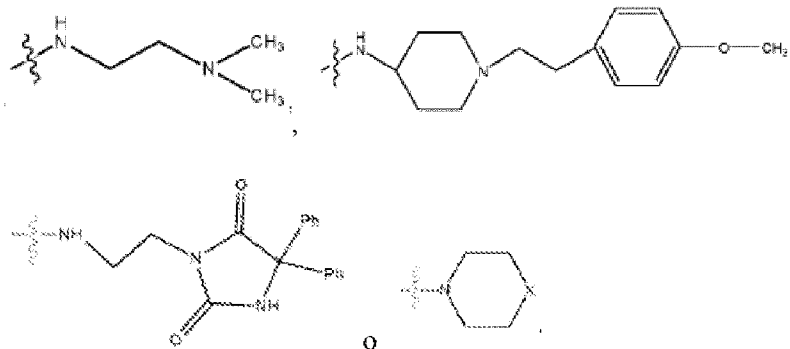
el enlace α está presente o ausente;

R_1 y R_2 son conjuntamente $=O$;

R_3 es OH , O^- u OR_9 ,

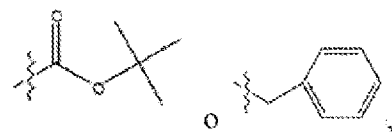
en donde R_9 es alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo;

R_4 es



donde X es O , S , NR_{10} , N^+HR_{10} o $N^+R_{10}R_{10}$,

donde cada R_{10} es independientemente H , alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo,



R_5 y R_6 tomados conjuntamente son $=O$;

R_7 y R_8 son cada uno H ;

o una sal, zwitterión o éster del mismo.

En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo y la cantidad de inhibidor de puntos de control se administran periódicamente al sujeto.

En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo y la cantidad de inhibidor de puntos de control se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

En algunas realizaciones, el inhibidor de puntos de control se administra paralelamente a, antes o después del compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo.

En algunas realizaciones, la cantidad de inhibidor de puntos de control y la cantidad de compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo, cuando se administran conjuntamente, es más efectiva para tratar al sujeto que cuando cada agente se administra por separado en la misma cantidad.

- 5 En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo y la cantidad de inhibidor de puntos de control, cuando se toman conjuntamente, es efectiva para reducir un síntoma clínico del cáncer en el sujeto.

En algunas realizaciones, el compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo potencia el efecto inmunoterapéutico del inhibidor de puntos de control.

- 10 En algunas realizaciones, el cáncer es susceptible de tratamiento mediante una respuesta inmunitaria.

El inhibidor de puntos de control es atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab.

- 15 En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, carcinoma urotelial o cáncer de ovario.

En algunas realizaciones, el cáncer es melanoma.

- 20 En algunas realizaciones, el compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo se administra a una dosis de 0,25 mg/m², 0,5 mg/m², 0,83 mg/m², 1,25 mg/m², 1,75 mg/m², 2,33 mg/m² o 3,1 mg/m².

En algunas realizaciones, el compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo se administra a una dosis de 2,33 mg/m².

- 25 En algunas realizaciones, el compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo se administra durante 3 días cada 3 semanas.

En algunas realizaciones, el ipilimumab se administra por vía intravenosa a una dosis de 0,5 mg/kg - 10 mg/kg o menos.

- 30 En algunas realizaciones, el ipilimumab se administra por vía intravenosa durante 90 minutos cada 3 semanas o menos.

- 35 En algunas realizaciones, el atezolizumab se administra por vía intravenosa a una dosis de 0,1 mg/kg - 20 mg/kg o menos.

En algunas realizaciones, el atezolizumab se administra por vía intravenosa durante 60 minutos cada 3 semanas o menos.

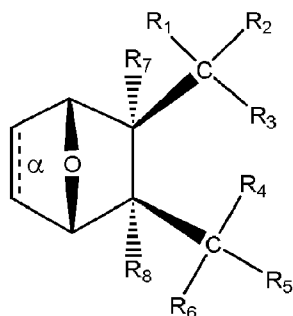
- 40 En algunas realizaciones, el nivolumab se administra por vía intravenosa a una dosis de 0,1 mg/kg - 10 mg/kg o menos.

En algunas realizaciones, el nivolumab se administra por vía intravenosa durante 60 minutos cada 2 semanas o menos.

- 45 En algunas realizaciones, el pembrolizumab se administra por vía intravenosa a una dosis de 1 mg/kg - 10 mg/kg o menos.

- 50 En algunas realizaciones, el pembrolizumab se administra por vía intravenosa durante 30 minutos cada 3 semanas o menos.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura:



o una sal, zwitterión o éster del mismo.

En algunas realizaciones, el enlace α está presente.

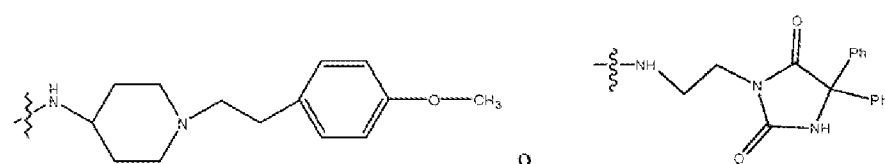
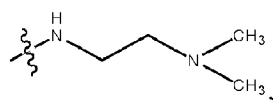
5 En algunas realizaciones, el enlace α está ausente.

En algunas realizaciones, R_9 es metilo, etilo o fenilo.

En algunas realizaciones, R_9 es metilo.

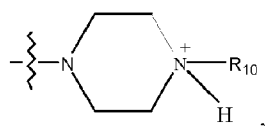
10

En algunas realizaciones, R_4 es



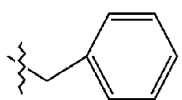
15

En algunas realizaciones, R_4 es



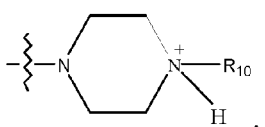
20

en donde R_{10} es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo o



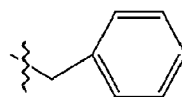
25

En algunas realizaciones, R_4 es

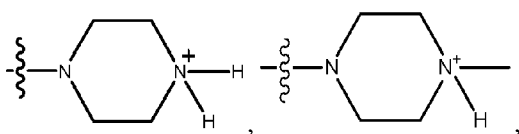


30

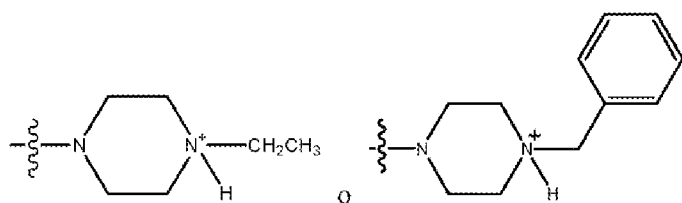
en donde R_{10} es -H, -CH₃, -CH₂CH₃ o



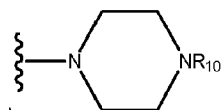
En algunas realizaciones, R_4 es



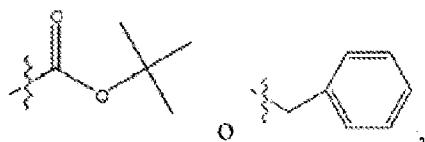
35



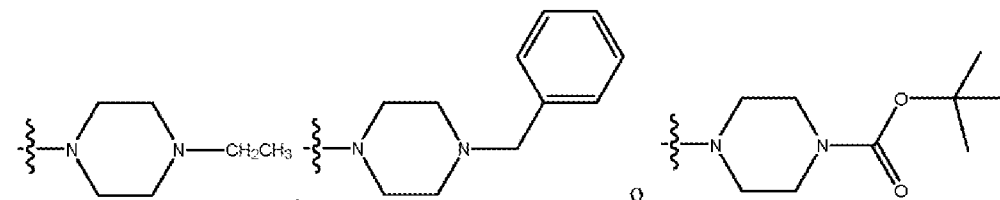
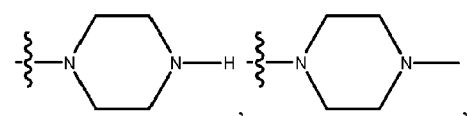
En algunas realizaciones, R₄ es



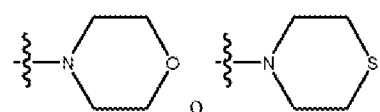
en donde R₁₀ es H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo,



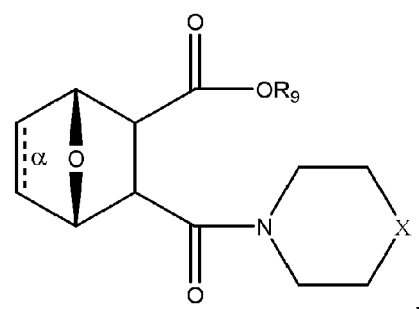
En algunas realizaciones, R₄ es



En algunas realizaciones, R₄ es



En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura



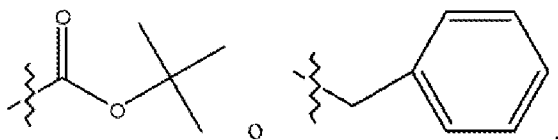
en donde

el enlace α está presente o ausente;

R_9 está presente o ausente y, cuando está presente, es alquilo, alquenilo, alquinilo o fenilo; y

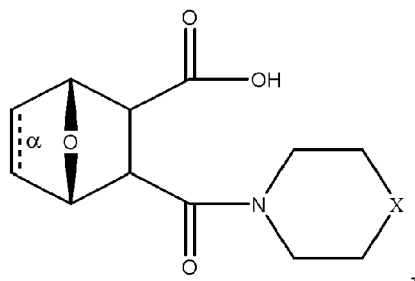
X es O, NR_{10} , N^+HR_{10} o $N^+R_{10}R_{10}$,

donde cada R_{10} es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo,



o una sal, zwitterión o éster del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura

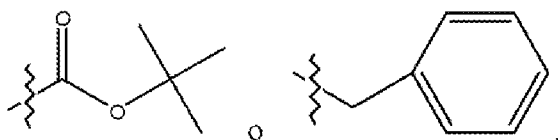


en donde

el enlace α está presente o ausente;

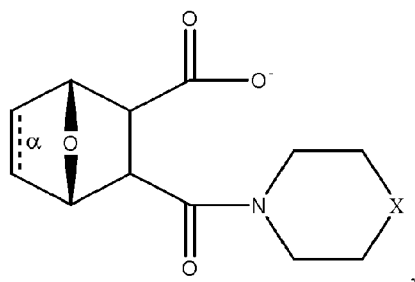
X es O o NR_{10} ,

donde cada R_{10} es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo,



o una sal, zwitterión o éster del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura

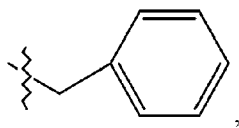


en donde

el enlace α está presente o ausente;

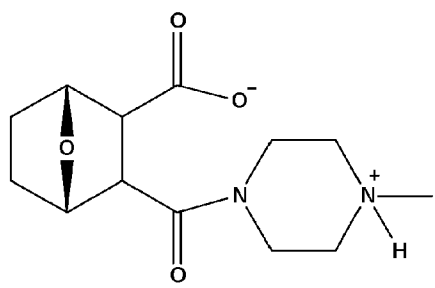
X es O o NH^+R_{10} ,

donde R₁₀ es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo,
o



o una sal, zwitterión o éster del mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto tiene la estructura



o una sal o éster del mismo.

También se describe un método de inhibición de la función de CTLA-4 en células T que comprende la administración a las células T de un inhibidor de PP2A para inhibir de este modo la función de CTLA-4.

También se describe un método de inhibición de la función de CTLA-4 en un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de un inhibidor de PP2A para inhibir de este modo la función de CTLA-4 en el sujeto.

También se describe un método de aumento de la activación de células T en un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de un inhibidor de PP2A para aumentar de este modo la activación de células T.

También se describe un método de aumento de la respuesta de células T a células cancerosas en un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de un inhibidor de PP2A para inhibir de este modo la respuesta de células T a las células cancerosas.

La presente invención también proporciona el inhibidor de PP2A para uso en un método de tratamiento de un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva de inhibidor de puntos de control CTLA-4 seleccionado a partir de ipilimumab y tremelimumab, y una cantidad efectiva de inhibidor de PP2A, en donde las cantidades, cuando se toman conjuntamente, son efectivas para tratar al sujeto.

En algunas realizaciones, el inhibidor de PP2A altera la interacción de PP2A con CTLA-4.

En algunas realizaciones, el inhibidor de PP2A disminuye la unión de PP2A a CTLA-4.

En algunas realizaciones, el cáncer es susceptible a la inmunoterapia anti-CTLA-4.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene una activación reducida de células T mediada por CTLA-4.

En algunas realizaciones, el cáncer tiene anomalías en la función de PP2A y/o en la vía de reparación de daños en el ADN.

En algunas realizaciones del método anterior, el inhibidor de PP2A es efectivo para tratar a un sujeto afectado por cáncer.

En algunas realizaciones, el inhibidor de PP2A altera la interacción de PP2A con CTLA-4.

En algunas realizaciones, el inhibidor de PP2A aumenta la unión de PP2A a CTLA-4.

Los cánceres susceptibles de inmunoterapia anti-CTLA-4 incluyen, entre otros, cánceres que han demostrado ser susceptibles de inmunoterapia anti-CTLA-4 en ensayos preclínicos o clínicos.

5 Los cánceres susceptibles de inmunoterapia anti-PD-1 o anti-PD-L1 incluyen, entre otros, cánceres que han demostrado ser susceptibles de inmunoterapia anti-PD-1 o anti-PD-L1 en ensayos preclínicos o clínicos.

En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto es efectiva para reducir un síntoma clínico del cáncer en el sujeto.

10 En algunas realizaciones, el tratamiento comprende el aumento de células T citotóxicas en el sujeto.

En algunas realizaciones, el tratamiento comprende el aumento de células T citotóxicas que interactúan con células cancerosas en el sujeto.

15 En algunas realizaciones, el tratamiento comprende el aumento de células cancerosas muertas por las células T citotóxicas en el sujeto.

20 Los tipos de células T incluyen células "asesinas" citotóxicas CD8⁺ y células T "colaboradoras" CD4⁺. Estas últimas abarcan subtipos implicados en la regulación de respuestas inmunitarias, como células "T_{reg}" y otras que estimulan el sistema inmunitario adquirido, incluido el reconocimiento de proteínas "no propias" que pueden estimular las células T asesinas o células B productoras de anticuerpos. Los clones específicos de células T, algunos de los cuales se mantienen después de la exposición al antígeno en niveles bajos como linfocitos T de "memoria", se activan mediante combinaciones particulares de MHC/epítipo, lo que conduce a la liberación de citocinas, la expansión clonal y respuestas inmunitarias adquiridas.

25 En algunas realizaciones, las células T son células T CD4⁺, células T CD8⁺ y/o células T CD4⁺CD8⁺.

30 En algunas realizaciones, el cáncer es carcinoma hepatocelular, osteosarcoma humano, cáncer primario de hígado, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, sarcoma de tejidos blandos, seminoma, cáncer de mama, linfoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, cáncer de ovario mucinoso, cáncer de vejiga urotelial, carcinoma de células escamosas del cuello uterino, linfoma difuso de células B grandes, adenoma de pulmón, hepatoma, cáncer intestinal fibrosarcoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, angiomiolipoma, adenocarcinoma mamario, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica crónica y mieloma múltiple y otras neoplasias de células plasmáticas.

35 En algunas realizaciones, el cáncer es adenoma de pulmón, hepatoma, carcinoma hepatocelular, cáncer intestinal, linfoma, fibrosarcoma, osteosarcoma, cáncer de próstata, angiomiolipoma o adenocarcinoma mamario.

En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia mieloide aguda.

40 En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple y neoplasias de células plasmáticas, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, linfoma, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, neuroblastoma, meduloblastoma, glioblastoma, cordoma, meningioma (maligno y no maligno), glioma pontino intrínseco difuso o tumor teratoide/rabdoide atípico.

45 En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple y neoplasias de células plasmáticas, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, linfoma, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin.

50 En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer cerebral.

55 En algunas realizaciones, el cáncer cerebral es un glioma, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso de bajo grado, astrocitoma anaplásico, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, ependimoma, meningioma, tumor de la glándula pituitaria, linfoma primario del sistema nervioso central, meduloblastoma, craneofaringioma o glioma pontino intrínseco difuso.

60 El método puede comprender además la administración al sujeto de un agente anticancerígeno, por ejemplo radiación X o radiación ionizante.

65 En algunas realizaciones, la célula objetivo es una célula cancerosa.

En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células grandes, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de páncreas, carcinoma de próstata, leucemia promielocítica, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, linfoma, linfoma no Hodgkin o linfoma de Hodgkin.

Los análogos de LB-100 tienen actividad análoga a LB-100 y exhiben efectos similares en los métodos descritos en el presente documento. Tales análogos incluyen los compuestos descritos en la Publicación de Solicitud Internacional PCT N° WO 2008/097561, publicada el 14 de agosto de 2008; la Publicación de Solicitud Internacional PCT N° WO 2010/014254, publicada el 4 de febrero de 2010; la Publicación de Solicitud Internacional PCT N° WO 2015/073802, publicada el 21 de mayo de 2015; y la Publicación de Solicitud Internacional PCT N° WO 2016/186963, publicada el 24 de noviembre de 2016.

Los compuestos que actúan como profármacos para la administración *in vivo* de LB-100 y/o endothal tienen actividad análoga a LB-100 y exhiben efectos similares en los métodos descritos en el presente documento. Más específicamente, la administración del profármaco proporciona un efecto similar a la administración de LB-100. Los profármacos de LB-100 y/o endothal incluyen los compuestos descritos en la Publicación de Solicitud Internacional PCT N° WO 2015/073802, publicada el 21 de mayo de 2015; y la Publicación de Solicitud Internacional PCT N° WO 2016/186963, publicada el 24 de noviembre de 2016.

Salvo que se especifique lo contrario, cuando la estructura de un compuesto utilizado en el método de esta invención incluye un átomo de carbono asimétrico, se entiende que el compuesto se presenta como racemato, mezcla racémica y enantiómero único aislado. Todas estas formas isoméricas de estos compuestos se incluyen expresamente en esta invención. Salvo que se especifique lo contrario, cada carbono estereogénico puede ser de configuración R o S. Debe entenderse en consecuencia que los isómeros que surgen de tal asimetría (por ejemplo todos los enantiómeros y diastereómeros) están incluidos dentro del alcance de esta invención, a menos que se indique lo contrario. Tales isómeros pueden obtenerse en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y mediante síntesis controlada estereoquímicamente, como las descritas en "Enantiomers, Racemates and Resolutions" por J. Jacques, A. Collet y S. Wilen, Pub. John Wiley & Sons, NY, 1981. Por ejemplo, la resolución puede llevarse a cabo mediante cromatografía preparativa en una columna quiral.

La invención en cuestión también presente incluir todos los isótopos de átomos que se encuentran en los compuestos en el método descrito en el presente documento. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. A modo de ejemplo y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Los isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

Se observará que cualquier notación de un carbono en estructuras a lo largo de esta solicitud, cuando se utiliza sin anotación adicional, pretende representar todos los isótopos de carbono, como ^{12}C , ^{13}C , o ^{14}C . Además, cualquier compuesto que contenga ^{13}C o ^{14}C puede tener específicamente la estructura de cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento. Se observará que cualquier notación de un hidrógeno en estructuras a lo largo de esta solicitud, cuando se utiliza sin anotación adicional, pretende representar todos los isótopos de hidrógeno, como ^1H , ^2H o ^3H . Además, cualquier compuesto que contenga ^2H o ^3H puede tener específicamente la estructura de cualquiera de los compuestos divulgados en el presente documento. Los compuestos etiquetados isotópicamente pueden prepararse generalmente mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia utilizando reactivos apropiados etiquetados isotópicamente en lugar de los reactivos no etiquetados empleados.

Se puede administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprenda un compuesto de la presente invención y al menos un portador farmacéuticamente aceptable para el tratamiento del cáncer en el sujeto.

El portador farmacéuticamente aceptable puede comprender un liposoma.

El compuesto puede estar contenido en un liposoma o una microesfera.

La composición farmacéutica puede comprender el inhibidor de PP2A y un inhibidor de puntos de control CTLA-4 seleccionado a partir de ipilimumab y tremelimumab.

En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

En algunas realizaciones, el compuesto y/o el inhibidor de puntos de control se administra al sujeto por vía oral.

También se divulga un método para optimizar la concentración de LB-100 en el torrente sanguíneo de un sujeto al que se ha administrado una dosis de LB-100 que comprende:

(a) medición de la concentración plasmática de LB-100 en el sujeto;

(b) determinación de si es necesario administrar una dosis adicional de LB-100 al sujeto en base a la medición realizada en (a); y

5 (c) administración de una dosis adicional o dosis adicionales de LB-100 según sea necesario en base a la determinación en (b).

El anterior paso (b) puede comprender la determinación de si es necesario administrar una dosis de LB-100 adicional al sujeto en base a que la medición en (a) sea superior, inferior o igual a la Concentración Mínima Efectiva (MEC) de LB-100.

10 La dosis inicial de LB-100 administrado al sujeto puede ser una cantidad de 0,1 mg/m² a 5 mg/m².

La dosis adicional de LB-100 administrado al sujeto puede ser una cantidad de 0,1 mg/m² a 5 mg/m².

15 El compuesto puede administrarse a una dosis de 0,25 mg/m², 0,5 mg/m², 0,83 mg/m², 1,25 mg/m², 1,75 mg/m², 2,33 mg/m² o 3,1 mg/m².

El compuesto puede administrarse a una dosis de 2,33 mg/m².

20 El compuesto puede administrarse durante 3 días cada 3 semanas.

La dosis adicional de LB-100 administrado al sujeto puede ser una cantidad de 25 % menos que la dosis inicial.

La dosis adicional de LB-100 administrado al sujeto puede ser una cantidad de 50 % menos que la dosis inicial.

25 La dosis adicional de LB-100 administrado al sujeto puede ser una cantidad de 75 % menos que la dosis inicial.

La dosis adicional de LB-100 administrado al sujeto puede ser una cantidad de 25 % más que la dosis inicial.

30 La dosis adicional de LB-100 administrado al sujeto puede ser una cantidad de 50 % más que la dosis inicial.

La dosis adicional de LB-100 administrado al sujeto puede ser una cantidad de 75 % más que la dosis inicial.

35 El sujeto puede tratarse adicionalmente con una terapia anticancerígena paralelamente a, antes o después de la administración.

Algunos ejemplos de terapia contra el cáncer son radioterapia o quimioterapia, terapia dirigida para promover la liberación de antígenos, vacunación para promover la presentación de antígenos, agonista de moléculas coestimuladoras o bloqueo de moléculas coinhibidoras para amplificar la activación de células T, inhibición de tráfico de células T reguladoras o de células supresoras derivadas de mieloides, factor de crecimiento endotelial antivascular para estimular la infiltración intratumoral de células T, transferencia adoptiva de células para aumentar el reconocimiento del cáncer mediante infiltración de células T o estimulación de la destrucción de tumores. Se pueden encontrar más ejemplos en Swart et al. 2016; Topalian et al. 2015; y Tsiatas et al. 2016.

45 La terapia anticancerígena puede comprender inmunoterapia. El término "inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto afectado por una enfermedad mediante un método que comprende la inducción, la mejora, la supresión o la modificación de una respuesta inmunitaria. Los agentes de inmunoterapia pueden incluir anticuerpos dirigidos a uno o más de CTLA-4, PD-1, PD-L1, GITR, OC40, LAG-3, KIR, TIM-3, B7-H3, B7-H4, CD28, CD40 y CD137.

50 La terapia anticancerígena puede comprender la administración de un agente anticancerígeno.

El agente anticancerígeno puede ser un modulador de puntos de control inmunitarios. El término "modulador de puntos de control inmunitarios" se refiere a un agente que interacciona directa o indirectamente con un punto de control inmunitario. Se pueden administrar moduladores de puntos de control inmunitarios para superar las señales inhibitorias y permitir y/o aumentar una adhesión inmunitaria contra células cancerosas. En algunas realizaciones, un modulador de puntos de control inmunitarios aumenta una respuesta efectora inmunitaria (por ejemplo la respuesta de células T citotóxicas). En algunas realizaciones, un modulador de puntos de control inmunitarios reduce, elimina o evita la tolerancia inmunitaria a uno o más antígenos. Por ejemplo, los moduladores de puntos de control inmunitarios pueden facilitar las respuestas de las células inmunitarias disminuyendo, inhibiendo o anulando la señalización por reguladores negativos de la respuesta inmunitaria (por ejemplo CTLA4), estimulando o potenciando la señalización de reguladores positivos de la respuesta inmunitaria (por ejemplo CD28) o evitando las respuestas autoinmunitarias y limitando el daño tisular mediado por células inmunitarias.

65 El agente anticancerígeno puede comprender un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo.

El agente anticancerígeno puede comprender un inhibidor de ligando 1 de muerte programada (PD-L1). El inhibidor PD-L1 puede ser atezolizumab.

Atezolizumab, el principio activo de Tecentriq™, es un anticuerpo humano bloqueante de ligando-1 de muerte programada (PD-L1). Atezolizumab se identifica por anticuerpos específicos (Tecentriq, Food and Drug Administration Approved Labeling (referencia ID:4000525) [online], Genentech Inc., 2016 [recuperado el 24 de febrero de 2017], recuperado de Internet: <URL: www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/761041lbl.pdf>).

La dosis recomendada y la pauta para atezolizumab es 1200 mg administrados por vía intravenosa durante 60 minutos cada 3 semanas hasta progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Las infusiones posteriores pueden administrarse durante 30 minutos si se tolera la primera infusión.

La administración de atezolizumab puede comprender 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg o menos de atezolizumab.

La administración periódica de atezolizumab puede comprender 1, 2, 3, 4 o menos administraciones de atezolizumab.

La administración de nivolumab puede ser cada 2 o 3 semanas o menos.

El anticuerpo o la parte de unión al antígeno del mismo puede unirse específicamente a un receptor de muerte programada-1 (PD-1) e inhibe la actividad de PD-1 ("anticuerpo anti-PD-1"). El anticuerpo anti-PD-1 puede ser nivolumab o pembrolizumab.

Nivolumab, el principio activo de Opdivo™, es un anticuerpo humano bloqueante de receptor-1 de muerte programada (PD-1). Nivolumab se identifica por anticuerpos específicos (Opdivo™, Food and Drug Administration Approved Labeling (referencia ID:3677021) [online], Bristol-Myers Squibb, 2014 [recuperado el 24 de febrero de 2017], recuperado de Internet: <URL: www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/125554lbl.pdf>).

La dosis recomendada y la pauta para nivolumab es 3 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 60 minutos cada 2 semanas durante 4 dosis hasta progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable.

La administración de nivolumab puede comprender 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg o menos de nivolumab.

La administración periódica de nivolumab puede comprender 1, 2, 3, 4 o menos administraciones de nivolumab.

La administración de nivolumab puede ser cada 2 o 3 semanas o menos.

Pembrolizumab, el principio activo de Keytruda™, es un anticuerpo humano bloqueante de receptor-1 de muerte programada (PD-1). Pembrolizumab se identifica por anticuerpos específicos (Keytruda, Food and Drug Administration Approved Labeling (referencia ID:3621876) [online], Merck & Co., 2014 [recuperado el 24 de febrero de 2017], recuperado de Internet: <URL: www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/125514lbl.pdf>).

La dosis recomendada y la pauta para pembrolizumab es 2 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 30 minutos cada 3 semanas hasta progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable.

La administración de pembrolizumab puede comprender 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg o menos de pembrolizumab..

La administración periódica de pembrolizumab puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o menos administraciones de pembrolizumab.

La administración de pembrolizumab puede ser cada 2 o 3 semanas o menos.

El anticuerpo Tge o la parte de unión al antígeno del mismo puede unirse específicamente al antígeno-4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) e inhibe la actividad de CTLA-4 ("anticuerpo anti-CTLA-4"). El anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser ipilimumab o tremelimumab.

Ipilimumab, el principio activo de Yervoy™, es un anticuerpo humano bloqueante de antígeno-4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). Ipilimumab se identifica por anticuerpos específicos (Yervoy, Food and Drug Administration Approved Labeling (Reference ID: 3839653) [online], Bristol-Myers Squibb, 2015 [recuperada el 24 de febrero de 2017], recuperada de Internet: <URL: www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/125377s073lbl.pdf>).

La dosis recomendada y la pauta para ipilimumab para melanoma irresecable o metastático es 3 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 90 minutos cada 3 semanas durante 4 dosis. La dosis recomendada y la pauta para

ipilimumab para el tratamiento adyuvante de melanoma es 10 mg/kg administrados por vía intravenosa durante 90 minutos cada 3 semanas durante 4 dosis, seguidos de 10 mg/kg cada 12 semanas durante un máximo de 3 años.

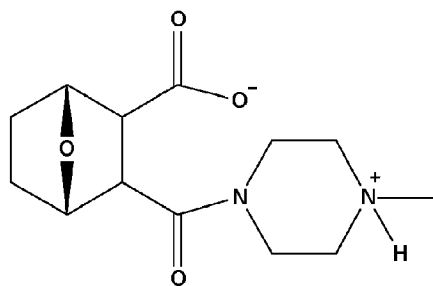
5 La administración de ipilimumab puede comprender 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg o menos de ipilimumab.

La administración periódica de ipilimumab puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o menos administraciones de ipilimumab.

10 La presente invención también proporciona el inhibidor de PP2A para uso en un método de tratamiento de un tumor o cáncer en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab, en donde el tumor o el cáncer es susceptible de tratamiento mediante una respuesta inmunitaria.

15 La presente invención también proporciona el inhibidor de PP2A para uso en un método de aumento de la respuesta de las células T a las células cancerosas en un sujeto afectado por cáncer, que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab para aumentar la respuesta de las células T.

20 En algunas realizaciones, el inhibidor de PP2A tiene la estructura:



25 En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de uno o más agentes anticancerígenos adicionales.

La presente invención también proporciona el inhibidor de PP2A para uso en un método de tratamiento de un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva de inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab, en donde las cantidades, cuando se toman conjuntamente, son efectivas para tratar al sujeto.

30 La presente invención también proporciona el inhibidor de PP2A para uso en un método de tratamiento de un sujeto afectado por cáncer y que recibe atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab, que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor de PP2A efectiva para reforzar el tratamiento en relación con atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab por separado.

35 En algunas realizaciones, el cáncer es susceptible de tratamiento mediante una respuesta inmunitaria.

40 Los compuestos de la presente invención son inhibidores de proteína fosfatasa 2A (PP2A). Los métodos de preparación se pueden encontrar en Lu et al., 2009; el documento US 7,998,957 B2; y el documento US 8,426,444 B2. El compuesto LB-100 es un inhibidor de PP2A in vitro en células cancerosas humanas y en xenoinjertos de células tumorales en ratones cuando se administra por vía parenteral en ratones. LB-100 inhibe el crecimiento de células cancerosas en sistemas modelo de ratón.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, un "síntoma" asociado a la lesión por reperusión incluye cualquier manifestación clínica o de laboratorio asociada a la lesión por reperusión y no se limita a lo que el sujeto puede sentir u observar.

50 Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento de las enfermedades" o "tratamiento", por ejemplo de la lesión por reperusión, abarca inducción de la prevención, inhibición, regresión o estasis de la enfermedad o de un síntoma o condición asociado a la enfermedad.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, "inhibición" de la progresión de la enfermedad o de la complicación de la enfermedad en un sujeto significa la prevención o la reducción de la progresión de la enfermedad y/o de la complicación de la enfermedad en el sujeto.

Tal como se utiliza en el presente documento, "alquilo" pretende incluir grupos hidrocarburo alifáticos saturados ramificados y de cadena lineal con el número de átomos de carbono especificado. Por lo tanto, C_1-C_n como en "alquilo C_1-C_n " se define para incluir grupos con 1, 2, ..., $n-1$ o n carbonos en una disposición lineal o ramificada, y específicamente incluye metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, etcétera. Una realización puede ser alquilo C_1-C_{20} , alquilo C_2-C_{20} , alquilo C_3-C_{20} , alquilo C_4-C_{20} , etcétera. Una realización puede ser alquilo C_1-C_{30} , alquilo C_2-C_{30} , alquilo C_3-C_{30} , alquilo C_4-C_{30} , etcétera. "Alcoxi" representa un grupo alquilo como se describió anteriormente unido a través de un puente de oxígeno.

El término "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarburo no aromático, lineal o ramificado, que contiene al menos 1 doble enlace carbono a carbono y puede estar presente hasta el máximo número posible de dobles enlaces carbono-carbono no aromáticos. Por lo tanto, alquenilo C_2-C_n se define para incluir grupos con 1, 2, ..., $n-1$ o n carbonos. Por ejemplo, "alquenilo C_2-C_6 " significa un radical alquenilo con 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono y al menos 1 doble enlace carbono-carbono y hasta, por ejemplo, 3 dobles enlaces carbono-carbono en el caso de un alquenilo C_6 , respectivamente. Los grupos alquenilo incluyen etenilo, propenilo, butenilo y ciclohexenilo. Como se describe anteriormente con respecto a alquilo, la parte lineal, ramificada o cíclica del grupo alquenilo puede contener dobles enlaces y puede estar sustituida si se indica un grupo alquenilo sustituido. Una realización puede ser alquenilo C_2-C_{12} , alquenilo C_3-C_{12} , alquenilo C_2-C_{20} , alquenilo C_3-C_{20} , alquenilo C_2-C_{30} o alquenilo C_3-C_{30} .

El término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarburo no aromático, lineal o ramificado, que contiene al menos 1 triple enlace carbono a carbono y puede estar presente hasta el máximo número posible de triples enlaces carbono-carbono no aromáticos. Por lo tanto, alquinilo C_2-C_n se define para incluir grupos con 1, 2, ..., $n-1$ o n carbonos. Por ejemplo, "alquinilo C_2-C_6 " significa un radical alquinilo con 2 o 3 átomos de carbono y 1 triple enlace carbono-carbono, o con 4 o 5 átomos de carbono y hasta 2 triples enlaces carbono-carbono, o con 6 átomos de carbono y hasta 3 triples enlaces carbono-carbono. Los grupos alquinilo incluyen etinilo, propinilo y butinilo. Como se describe anteriormente con respecto a alquilo, la parte lineal, ramificada o cíclica del grupo alquinilo puede contener triples enlaces y puede estar sustituida si se indica un grupo alquinilo sustituido. Una realización puede ser un alquinilo C_2-C_n . Una realización puede ser alquinilo C_2-C_{12} o alquinilo C_3-C_{12} , alquinilo C_2-C_{20} , alquinilo C_3-C_{20} , alquinilo C_2-C_{30} o alquinilo C_3-C_{30} .

Tal como se utiliza en el presente documento, "arilo" pretende significar cualquier anillo de carbono monocíclico o bicíclico estable de hasta 10 átomos de carbono en cada anillo, en donde al menos un anillo es aromático. Algunos ejemplos de tales elementos de arilo incluyen fenilo, naftilo, tetrahidro-naftilo, indanilo, bifenilo, fenantrilo, antrilo o acenaftilo. En casos en los que el sustituyente arilo es bicíclico y un anillo no es aromático, se entiende que la unión se realiza a través del anillo aromático. Los arilos sustituidos incluidos en esta invención incluyen sustitución de cualquier posición adecuada con aminas, aminas sustituidas, alquilaminas, hidroxilos y alquilhidroxilos, en donde la parte "alquilo" de las alquilaminas y alquilhidroxilos es un alquilo C_2-C_n como se define anteriormente. Las aminas sustituidas pueden sustituirse por grupos alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo como se define anteriormente.

Cada aparición de alquilo, alquenilo o alquinilo está ramificada o no ramificada, sustituida o no sustituida.

Los sustituyentes alquilo, alquenilo, alquinilo y arilo pueden ser no sustituidos o no sustituidos, a menos que se defina específicamente lo contrario. Por ejemplo, un alquilo (C_1-C_6) puede estar sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados a partir de OH, oxo, halógeno, alcoxi, dialquilamino o heterociclilo, como morfolinilo, piperidinilo, etcétera.

En los compuestos de la presente invención, los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo pueden estar sustituidos además mediante reemplazo de uno o más átomos de hidrógeno por grupos no hidrógeno descritos en el presente documento en la medida de lo posible. Estos incluyen, entre otros, halo, hidroxilo, mercapto, amino, carboxi, ciano y carbamilo.

El término "sustituido" tal como se utiliza en el presente documento significa que una estructura dada tiene un sustituyente que puede ser un grupo alquilo, alquenilo o arilo como se define anteriormente. Se considerará que el término incluye múltiples grados de sustitución pro un sustituyente nombrado. Cuando se divulguen o reivindiquen múltiples fracciones de sustituyente, el compuesto sustituido puede estar sustituido independientemente por una o más de las fracciones de sustituyente reivindicadas, individual o pluralmente. Por sustituido independientemente se entiende que los (dos o más) sustituyentes pueden ser iguales o diferentes.

Se entiende que los sustituyentes y los patrones de sustitución de los compuestos de la invención inmediata pueden ser seleccionados por un experto ordinario en la materia para proporcionar compuestos que sean químicamente estables y que puedan sintetizarse fácilmente mediante técnicas conocidas de la técnica, así como los métodos que se exponen a continuación, a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Si un sustituyente está sustituido de por sí con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden estar en el mismo carbono o en diferentes carbonos, siempre que resulte una estructura estable.

Tal como se utiliza en el presente documento, la "administración" de un agente puede realizarse utilizando cualquiera de los diversos métodos o sistemas de suministro bien conocidos por los expertos en la materia. La administración puede realizarse, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposomal, por inhalación, vaginal, intraocular, vía de

suministro local, subcutánea, intraadiposa, intraarticular, intratecal, en un ventrículo cerebral, intraventricular, intratumoral, en parénquima cerebral o intraparenquimalida.

5 Los siguientes sistemas de suministro, que emplean una serie de portadores farmacéuticos utilizados de forma rutinaria, pueden utilizarse pero solo son representativos de los muchos sistemas posibles previstos para la administración de composiciones de acuerdo con la invención.

10 Los sistemas de administración de fármacos inyectables incluyen soluciones, suspensiones, geles, microesferas e inyectables poliméricos, y pueden comprender excipientes como agentes que alteran la solubilidad (por ejemplo etanol, propilenglicol y sacarosa) y polímeros (por ejemplo policaprilactonas y PLGA).

15 Otros sistemas de suministro de drogas inyectables incluyen soluciones, suspensiones, geles. Los sistemas de suministro oral incluyen comprimidos y cápsulas. Estos pueden contener excipientes como aglutinantes (por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, otros materiales celulósicos y almidón), diluyentes (por ejemplo lactosa y otros azúcares, almidón, fosfato dicálcico y materiales celulósicos), agentes disgregantes (por ejemplo polímeros de almidón y materiales celulósicos) y agentes lubricantes (por ejemplo estearatos y talco).

Los sistemas implantables incluyen varillas y discos y pueden contener excipientes como PLGA y policaprolactona.

20 Los sistemas de suministro oral incluyen comprimidos y cápsulas. Estos pueden contener excipientes como aglutinantes (por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, otros materiales celulósicos y almidón), diluyentes (por ejemplo lactosa y otros azúcares, almidón, fosfato dicálcico y materiales celulósicos), agentes disgregantes (por ejemplo polímeros de almidón y materiales celulósicos) y agentes lubricantes (por ejemplo estearatos y talco).

25 Los sistemas de suministro transmucosa incluyen parches, comprimidos, supositorios, pesarios, geles y cremas, y pueden contener excipientes como solubilizantes y potenciadores (por ejemplo propilenglicol, sales biliares y aminoácidos) y otros vehículos (por ejemplo polietilenglicol, ésteres y derivados de ácidos grasos, y polímeros hidrófilos como hidroxipropilmetilcelulosa y ácido hialurónico).

30 Los sistemas de suministro dérmico incluyen, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, ungüentos, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases y polvos de hidrocarburo, y pueden contener excipientes como solubilizantes, potenciadores de la permeación (por ejemplo ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos) y polímeros hidrófilos (por ejemplo policarbófilo y polivinilpirrolidona). En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.

35 Las soluciones, suspensiones y polvos para sistemas de suministro reconstituibles incluyen vehículos como agentes de suspensión (por ejemplo gomas, zantanos, celulósicos y azúcares), humectantes (por ejemplo sorbitol), solubilizadores (por ejemplo etanol, agua, PEG y propilenglicol), tensioactivos (por ejemplo laurilsulfato de sodio, Spans, Tweens y cetilpiridina), conservantes y antioxidantes (por ejemplo parabenos, vitaminas E y C y ácido ascórbico), agentes antiaglomerantes, agentes de recubrimiento y agentes quelantes (por ejemplo EDTA).

40 Tal como se utiliza en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o excipientes que es adecuado para su uso en humanos y/o animales sin efectos secundarios adversos indebidos (como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable, un agente de suspensión o un vehículo, para administrar los compuestos inmediatos al sujeto.

45 Los compuestos de la presente invención pueden estar en forma de sal. Tal como se utiliza en el presente documento, una "sal" es una sal de los compuestos instantáneos que ha sido modificada mediante la producción de sales ácidas o básicas de los compuestos. En el caso de los compuestos utilizados para tratar una infección o enfermedad, la sal es farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, sales minerales o de ácidos orgánicos o residuos básicos como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos como fenoles. Las sales se pueden producir utilizando un ácido orgánico o inorgánico. Tales sales ácidas son cloruros, bromuros, sulfatos, nitratos, fosfatos, sulfonatos, formatos, tartratos, maleato, malatos, citratos, benzoato, salicilatos, ascorbato y similares. Las sales de fenoles son las sales de metales alcalinotérreos, sodio, potasio o litio. El término "sal farmacéuticamente aceptable" a este respecto se refiere a las sales de adición de ácido o base relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas, de los compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos de la invención o haciéndose reaccionar por separado un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre o ácido libre con un ácido o base orgánico o inorgánico adecuado, y aislándose la sal formada de este modo. Las sales representativas incluyen las sales de hidrobromuro, hidrocloreuro, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, vale rato, oleato, palmitato, estearato, la urato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilo, mesilato, gluconato, lactobacilos y laurilsulfato y similares. (Véase, por ejemplo, Beige et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharma. Sci. 66: 1-19).

La presente invención incluye ésteres o ésteres farmacéuticamente aceptables de los compuestos del presente método. El término "éster" incluye, entre otros, un compuesto que contiene el grupo R-CO-OR'. La parte "R-CO-O" puede derivarse del compuesto original de la presente invención. La parte "R" incluye, entre otros, grupos alquilo, alquenilo, alquínilo, heteroalquilo, arilo y carboxialquilo.

La presente invención incluye ésteres de profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos del presente método. Los ésteres de profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención son derivados de ésteres que son convertibles en los ácidos carboxílicos libres del compuesto original por solvólisis o en condiciones fisiológicas. Un ejemplo de profármaco es un éster de alquilo que se escinde *in vivo* para producir el compuesto de interés.

El compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo, se proporciona opcionalmente en una composición farmacéuticamente aceptable que incluya los portadores apropiados farmacéuticamente aceptables.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "cantidad" o "dosis" de un agente medida en miligramos se refiere a los miligramos de agente presente en un producto farmacéutico, independientemente de la forma del producto farmacéutico.

Los Institutos Nacionales de Salud (NIH) proporcionan una tabla de Factores de Conversión de Dosis por Área de superficie Equivalente (Tabla A) que proporciona factores de conversión que consideran las relaciones entre área de superficie y peso entre especies.

Tabla A: Factores de Conversión de Dosis por Área de Superficie Equivalente

De	Para					
		Ratón 20 g	Rata 150 g	Mono 3 kg	Perro 8 kg	Hombre 60 kg
	Ratón	1	1/2	1/4	1/6	1/12
	Rata	2	1	1/2	1/4	1/7
	Mono	4	2	1	3/5	1/3
	Perro	6	4	1 2/3	1	1/2
	Hombre	12	7	3	2	1

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (como toxicidad, irritación o respuesta alérgica proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable cuando se utiliza de la manera de esta invención. La cantidad efectiva específica variará con factores tales como la condición particular que se está tratando, la condición física del paciente, el tipo de mamífero tratado, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay) y las formulaciones específicas y la estructura de los compuestos o sus derivados.

Cuando se da un intervalo en la especificación, se entiende que el intervalo incluye todos los números enteros y 0,1 unidades dentro de este intervalo y cualquier subintervalo de los mismos. Por ejemplo, un intervalo de 77 a 90 % es una divulgación de 77, 78, 79, 80 y 81 % etc.

Tal como se utiliza en el presente documento, "alrededor de" respecto a un número indicado abarca un intervalo de +uno por ciento a -uno por ciento del valor indicado. Por lo tanto, a modo de ejemplo, alrededor de 100 mg/kg incluye 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9, 100, 100,1, 100,2, 100,3, 100,4, 100,5, 100,6, 100,7, 100,8, 100,9 y 101 mg/kg. En consecuencia, en una realización, alrededor de 100 mg/kg incluye 100 mg/kg.

Se entiende que cuando se proporciona un intervalo de parámetros, todos los números enteros dentro de este intervalo y las décimas de los mismos, también son proporcionados por la invención. Por ejemplo, "0,2-5 mg/kg/día" es una divulgación de 0,2 mg/kg/día, 0,3 mg/kg/día, 0,4 mg/kg/día, 0,5 mg/kg/día, 0,6 mg/kg/día etc. hasta 5,0 mg/kg/día.

Para las anteriores realizaciones, cada realización divulgada en el presente documento se considera aplicable a cada una de las otras realizaciones divulgadas. Por lo tanto, todas las combinaciones de los diversos elementos descritos en el presente documento están dentro del alcance de la invención.

Esta invención se entenderá mejor por referencia a los detalles experimentales que siguen, pero los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son solo ilustrativos de la invención tal como se describe detalladamente en las reivindicaciones que siguen a continuación.

TERAPIA COMBINADA

La administración de dos fármacos para tratar una condición dada, como el melanoma, plantea una serie de problemas potenciales. Las interacciones in vivo entre dos fármacos son complejas. Los efectos de cualquier fármaco están relacionados con su absorción, distribución y eliminación. Cuando se introducen dos fármacos en el cuerpo, cada fármaco puede afectar la absorción, distribución y eliminación del otro y, por consiguiente, alterar los efectos del otro. Por ejemplo, un fármaco puede inhibir, activar o inducir la producción de enzimas implicadas en una ruta metabólica de eliminación del otro fármaco. (Guidance for Industry, 1999) Por lo tanto, cuando se administran dos fármacos para tratar la misma condición, es impredecible si cada uno complementará, no tendrá ningún efecto o interferirá con la actividad terapéutica del otro en un sujeto humano.

La interacción entre dos fármacos no solo puede afectar la actividad terapéutica prevista de cada fármaco, sino que la interacción puede aumentar los niveles de metabolitos tóxicos (Guidance for Industry, 1999). La interacción también puede aumentar o reducir los efectos secundarios de cada fármaco. Por lo tanto, tras la administración de dos fármacos para tratar una enfermedad, es impredecible el cambio que se producirá en el perfil de efectos secundarios negativos de cada fármaco.

Además, es difícil predecir con precisión cuándo se manifestarán los efectos de la interacción entre los dos fármacos. Por ejemplo, las interacciones metabólicas entre fármacos pueden hacerse evidentes tras la administración inicial del segundo fármaco, después de que ambos hayan alcanzado una concentración en estado estable o tras interrupción de uno de los fármacos. (Guidance for Industry, 1999)

DETALLES EXPERIMENTALES

Ejemplo 1. Inhibición de PP2A y actividad de CTLA-4

El compuesto LB-100 y otros homólogos de LB-100 divulgados en el presente documento inhiben la función de CTLA-4 en células T al alterar la interacción de CTLA-4 y PP2A, bloqueando de este modo la inhibición mediada por CTLA-4 de la activación de células T. Tal interacción da como resultado un aumento de la activación de células T.

Ejemplo 2. Estudios in vitro: PP2A y CTLA4

Se tratan células T humanas primarias y células T Jurkat con LB-100 y se miden los niveles de activación de las células T. LB-100 aumenta la activación de las células T.

Se tratan células T humanas primarias y células T Jurkat con LB-100 y se evalúa la interacción PP2A:CTLA-4. LB-100 disminuye la interacción de PP2A y CTLA-4.

Se tratan células T humanas primarias y células T Jurkat con LB-100 y se miden los niveles de fosforilación de PP2A. LB-100 aumenta la fosforilación en las células T.

Ejemplo 3. Administración de LB-100 y análogos

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 a un sujeto afectado por cáncer. La cantidad de compuesto es efectiva para tratar el cáncer al aumentar el número de células T citotóxicas en el sujeto.

Se administra un análogo del compuesto LB-100 divulgado en el presente documento a un sujeto afectado por cáncer. La cantidad de compuesto es efectiva para tratar el cáncer al aumentar el número de células T citotóxicas en el sujeto.

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 a un sujeto afectado por melanoma. La cantidad de compuesto es efectiva para tratar el cáncer al aumentar el número de células T citotóxicas en el sujeto.

Se administra un análogo del compuesto LB-100 divulgado en el presente documento a un sujeto afectado por melanoma. La cantidad de compuesto es efectiva para tratar el cáncer al aumentar el número de células T citotóxicas en el sujeto.

Ejemplo 4. Administración de LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control CTLA-4

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control CTLA-4 a un sujeto afectado por cáncer. La cantidad de compuesto e inhibidor es efectiva para tratar al sujeto.

5 Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control CTLA-4 a un sujeto afectado por cáncer. La cantidad de compuesto es efectiva para potenciar la actividad anticancerígena del inhibidor de puntos de control CTLA-4.

10 Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control CTLA-4 a un sujeto afectado por melanoma. La cantidad de compuesto e inhibidor es efectiva para tratar al sujeto.

15 Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control CTLA-4 a un sujeto afectado por melanoma. La cantidad de compuesto es efectiva para potenciar la actividad anticancerígena del inhibidor de puntos de control CTLA-4.

Ejemplo 5: Evaluación de la eficacia de LB-100 como terapia complementaria a ipilimumab o tremelimumab

La terapia complementaria proporciona un efecto sinérgico y permite dosis más bajas con efectos secundarios reducidos.

20 La administración periódica de LB-100 como terapia complementaria para un paciente humano afectado por melanoma que ya está recibiendo ipilimumab o tremelimumab proporciona una ventaja clínicamente significativa y es más efectiva (proporciona al menos un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en el tratamiento del paciente que cuando se administra solo ipilimumab o tremelimumab (en la misma dosis).

25 La administración periódica de ipilimumab o tremelimumab como terapia complementaria para un paciente humano afectado por melanoma que ya está recibiendo LB-100 proporciona una ventaja clínicamente significativa y es más efectiva (proporciona al menos un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en el tratamiento del paciente que cuando se administra solo LB-100 (en la misma dosis).

30 Las terapias complementarias también proporcionan eficacia (proporcionan al menos un efecto aditivo o más de un efecto aditivo) en el tratamiento del paciente sin efectos secundarios adversos indebidos o que afecten la seguridad del tratamiento. En comparación con la administración de cada agente por separado:

35 1. La terapia complementaria es más efectiva (proporciona un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en el aumento de la cantidad de células T citotóxicas en pacientes con melanoma;

40 2. La terapia complementaria es más efectiva (proporciona un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en la ralentización de la progresión del melanoma en pacientes con melanoma; y/o

3. La terapia complementaria es más efectiva (proporciona un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en la reducción de la función de CTLA-4 en los pacientes con melanoma.

DISCUSIÓN (Ejemplos 1-5)

45 La importancia del sistema inmunitario en el contexto del cáncer se ha reconocido cada vez más con el desarrollo de la inmunoterapia del cáncer. El mecanismo de control natural del sistema inmunitario para prevenir la autoinmunidad es cooptado frecuentemente por tumores para evadir la inmunovigilancia. Las moléculas de puntos de control, como la muerte programada-1 (PD-1) y la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), son reguladores negativos del sistema inmunitario que son activados constitutivamente por los tumores para suprimir la actividad de las células T citotóxicas que reconocen los neoantígenos de tumores (Topalian et al. 2015). Las células T reguladoras inmunosupresoras (Tregs) también se reclutan en el microambiente tumoral (TME) para reducir la eficacia de las células T CD8. Los anticuerpos monoclonales que bloquean la señalización de PD-1 o CTLA-4 podrían inducir respuestas duraderas a largo plazo en algunos pacientes con melanoma metastático. Esto llevó a la aprobación de ipilimumab (anti-CTLA-4) en 2011 y nivolumab (anti-PD-1) en 2014 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para el tratamiento del melanoma avanzado. Se están llevando a cabo ensayos clínicos actuales para expandir el uso de inhibidores de puntos de control a muchos otros tipos de cáncer, lo que marca el comienzo de un cambio de paradigma en el planteamiento de la terapia contra el cáncer. Sin embargo, solo un subconjunto de pacientes responde a la inhibición de puntos de control de manera efectiva como agente único, lo que destaca el hecho de que múltiples mecanismos redundantes están implicados en la creación de un TME inmunosupresor. Por lo tanto, un área activa de investigación es la identificación de estrategias combinadas que podrían aumentar el efecto de la inhibición de puntos de control.

65 El antígeno-4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) es una glicoproteína inducida por activación de la superfamilia de inmunoglobulinas cuya función principal es reducir las respuestas de células T (Brunet, J.F. et al. 1987). CTLA-4 se expresa en la superficie de las células T, donde suprime principalmente sus etapas tempranas de

activación mediante la inducción de la señalización inhibitoria del receptor de células T (TCR) aguas abajo y al contrarrestar la actividad del receptor coestimulador de células T, CD28, inhibiendo de este modo la activación de células T y aumentando la tolerancia inmunitaria a ciertas enfermedades, pro ejemplo cáncer. Se han documentado diversos mecanismos, incluyendo el antagonismo de la coestimulación dependiente de CD28 y la señalización negativa directa para explicar la capacidad inhibitoria de CTLA-4 (Carreno, B.M. et al. 2000). Ya que la cola citoplasmática de CTLA-4 carece de actividad enzimática intrínseca, es probable que la entrega de dicha señal negativa se proporcione a través de la asociación de CTLA-4 con moléculas de señalización clave (Teff, W.A. Et al. 2006).

La inhibición de CTLA-4 se ha dirigido al tratamiento de cánceres mediante un bloqueo de puntos de control inmunitarios. Los modelos celulares y murinos de neoplasias malignas demuestran que el bloqueo del antígeno-4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), un regulador negativo de respuestas de células T, aumenta las respuestas endógenas a las células tumorales, lo que conduce a la muerte de las células tumorales cuando se utiliza solo o con otras intervenciones terapéuticas (Grosso, J.F. et al. 2013). Los hallazgos preclínicos se han traducido en el desarrollo clínico de un anticuerpo monoclonal IgG1 (mAb) completamente humano, ipilimumab y un mAb IgG2 completamente humano, tremelimumab, cada uno de los cuales se une a CTLA-4.

La fosforilación de proteínas por quinasas y su desfosforilación por fosfatasa son componentes críticos de las vías de señalización celular que regulan una multiplicidad de procesos, incluida la proliferación celular y la muerte celular (Shi et al. 2009). Aunque las fosfatasa se han considerado durante mucho tiempo objetivos potencialmente importantes para el tratamiento del cáncer, ha habido pocos esfuerzos para desarrollar inhibidores de fosfatasa debido a la preocupación por la toxicidad (Janssens et al. 2012).

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es una serina/treonina fosfatasa ubicua que desfosforila numerosas proteínas de vías de respuesta tanto dependientes como independientes de ATM/ATR (Mumby M. 2007). PP2A está implicada en un conjunto diverso de procesos celulares. En el sistema inmunitario, se ha demostrado que la PP2A se asocia con CTLA-4 y media la desfosforilación de Akt, lo que conduce a la inhibición de células T activadas (Parry et al. 2005). Se ha demostrado previamente que la inhibición farmacológica de PP2A sensibiliza las células cancerosas al daño de ADN mediado por radiación a través de la fosforilación de diversas proteínas de señalización, como p53, yH2AX, PLK1 y Akt, lo que resulta en la desregulación del ciclo celular, la inhibición de la reparación de ADN y la apoptosis (Wei, D. et al. 2013).

La cantaridina, el principal ingrediente activo del extracto de escarabajo de la ampolla (*Mylabris*), es un compuesto derivado de la medicina tradicional china que ha demostrado ser un potente inhibidor de PP2A (Efferth, T. et al. 2005). Aunque la cantaridina se ha utilizado anteriormente en el tratamiento de los hepatomas y ha demostrado eficacia contra líneas celulares de leucemia multirresistentes a drogas (Efferth, T. et al. 2002), su grave toxicidad limita su utilidad clínica. Se informó de que la cantaridina, una toxina natural, y su análogo desmetilado, la norcantaridina, ambas potentes inhibidores de PP2A (Bertini et al. 2009) tienen actividad anticancerígena en pacientes en China con cánceres gastrointestinales (Wang et al. 1989), aunque se dispone de pocos detalles clínicos.

La fostriecina, otro inhibidor selectivo de PP2A es evaluó en diversos estudios de fase 1 patrocinados por el NCI de los Estados Unidos hace más de veinte años. En el ensayo más grande, la fostriecina se asoció a la estabilidad de la enfermedad en 16 (34,8 %) de 46 pacientes con tumores sólidos sin toxicidad limitante de la dosis (DLT) (Lê et al. 2004). No se completaron ensayos debido al insuficiente suministro de fármaco.

LB-100 es una molécula pequeña derivada de cantaridina con toxicidad significativamente menor. LB-100 y su homólogo liposoluble, LB-102, inhibe la proliferación de líneas celulares de una variedad de tumores sólidos humanos. Ambos compuestos potencian la actividad sin aumentar significativamente la toxicidad de cisplatino, doxorubicina y temozolomida contra xenoinjertos de carcinoma pancreático y hepatocelular; fibrosarcoma; feocromocitoma; neuroblastoma; y glioblastoma y de rayos X focales contra xenoinjertos de páncreas, nasofaringe y glioblastoma (Bai et al., 2014a; Bai et al., 2014b; Zhang et al., 2010; Martiniova et al., 2011; Lu et al., 2009; Wei et al., 2013; Lv et al., 2014; Gordon et al., 2015). Además, LB-100 revirtió la resistencia a cisplatino en xenoinjertos de carcinoma de ovario y meduloblastoma (Chang et al., 2015; Ho et al., 2016). Estudios preclínicos han mostrado que LB-100 puede potenciar los efectos citotóxicos de temozolomida, doxorubicina y la radioterapia contra glioblastoma (GBM), el feocromocitoma metastático y el cáncer de páncreas (Wei, D. et al. 2013; Lu, J. et al. 2009; Zhang, C. et al. 2010; Martiniova, L. et al. 2011).

LB-100 se está sometiendo también a un estudio de fase 1 en combinación con docetaxel para el tratamiento de tumores sólidos (Chung, V. 2013). LB-100 es un nuevo inhibidor de molécula pequeña de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) de primera categoría, que ha demostrado recientemente ser bien tolerado a dosis asociadas a la estabilización de tumores sólidos progresivos en un ensayo de fase 1 (Chung et al. 2017). PP2A ha sido implicado en la mediación de la señalización de Akt aguas abajo de CTLA-4 (Parry et al. 2005). En un cribado de ARN de horquilla corta agrupado *in vivo* se descubrió que Ppp2r2d, una subunidad reguladora de PP2A, al desactivarse, aumentaba la proliferación de linfocitos infiltrantes tumorales en la mayor medida posible entre todos los genes de la biblioteca de ARN se identificó PP2A como un regulador clave en la supresión de células T en el microambiente tumoral (Zhou et al. 2014). Además, se descubrió que PP2A es esencial para la función reguladora de células T (Treg) (Apostolidis et al. 2014).

Si bien múltiples estudios preclínicos han demostrado que LB-100 es un quimiosensibilizador o radiosensibilizador efectivo en diversos modelos tumorales (Hone et al. 2015), ninguno ha estudiado su efecto sobre el sistema inmunológico.

El deterioro de la función de CTLA-4 permite a los pacientes con cáncer montar un ataque de células T citotóxicas más efectivo en sus cánceres. A diferencia del principal modulador de CTLA-4 utilizado clínicamente, el anticuerpo ipilimumab (Yervoy), que se asocia a una toxicidad significativa a dosis terapéuticamente efectivas, el compuesto LB-100 se asocia a la estabilidad de diversos tipos de cáncer en ausencia de toxicidad o efectos secundarios significativos.

Existen varios informes de actividad clínica mediante la inhibición de CTLA-4 con ipilimumab, particularmente en pacientes con melanoma avanzado. Estos estudios muestran que ipilimumab como agente único y en combinación con un fármaco citotóxico como dacarbazina o con otro inhibidor de puntos de control inmunitarios, nivolumab, provocan la regresión de los cánceres. Solo o en combinación con otros agentes, ipilimumab se asocia a una toxicidad significativa, como en el estudio de Hodi et al. (2010) en el que hasta el 15 % de pacientes tenían efectos adversos de grado 3 o 4, incluyendo una incidencia de muerte de 2,1 %. Wolchok et al (2013) estudiaron ipilimumab más nivolumab en pacientes con melanoma avanzado, pero se produjeron eventos adversos de grado 3 o 4 en el 53 % de los pacientes. Por lo tanto, la disponibilidad de una molécula como LB-100, que no tiene toxicidad limitante a dosis asociadas a la estabilización del cáncer progresivo y tiene actividad anti CTLA-4, es un candidato clínico atractivo para el tratamiento de cánceres humanos. En la actualidad no existen determinantes moleculares de respuesta clínica a la modulación de CTLA-4. Snyder et al (2014) informaron de una base genética para el beneficio potencial del tratamiento de melanoma con CTLA-4, proporcionando una base potencial para la caracterización de neoantígenos tumorales candidatos para cada paciente.

Sin vincularse a ninguna teoría, se cree que CTLA-4 interacciona con PP2A en células T humanas y tal interacción es esencial para el correcto funcionamiento de CTLA-4. Cuando funciona correctamente, CTLA-4 inhibe la activación de células T, reduciendo de este modo la inmunorespuesta a células cancerosas. La administración de un inhibidor de PP2A a un sujeto con cáncer altera la interacción de PP2A con CTLA-4, perturbando de este modo la función normal de CTLA-4. La reducción o la eliminación de la función de CTLA-4 en células T conduce a un aumento de la activación de las células T. El aumento de la activación de células T da como resultado un aumento de células T citotóxicas en el sujeto que atacan y destruyen las células cancerosas. Al igual que los inhibidores de puntos de control inmunitarios existentes, LB-100 es efectivo por separado y/o en combinación con otros inhibidores de puntos de control.

Ejemplo 6. Evaluación de LB-100 en pacientes adultos con tumores sólidos progresivos

La PP2A ha sido reconocida durante mucho tiempo como objetivo potencialmente importante para la terapia del cáncer debido a su papel regulador en la división celular, la respuesta a daños en el ADN, la reparación de la recombinación homóloga y la salida mitótica, pero se ha considerado que es probablemente demasiado tóxica para el uso clínico. Este estudio muestra la seguridad, tolerabilidad y la actividad anticancerígena potencial de un inhibidor de PP2A, LB-100, en pacientes con tumores sólidos refractarios. La actividad de PP2A es alterada por mutación directa o indirectamente en muchos tipos de cáncer. La disponibilidad de un inhibidor clínicamente seguro de PP2A abre una nueva posibilidad prometedora para la terapia del cáncer, concretamente la inhibición farmacológica de PP2A en cánceres con anomalías adquiridas mutacionalmente en la función de PP2A y/o en la vía de reparación de daños en el ADN. Los resultados de este estudio apoyan el desarrollo de LB-100 por separado y en combinación con otros agentes para el tratamiento de cánceres.

Propósito: evaluar la seguridad, tolerabilidad y actividad potencial de LB-100, un inhibidor de molécula pequeña de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) de primera categoría en pacientes adultos con tumores sólidos progresivos.

Diseño experimental: se administró LB-100 por vía intravenosa diariamente durante 3 días en ciclos de 21 días en un diseño de escalado de dosis 3+3. El objetivo principal era determinar la dosis máxima tolerada y la dosis recomendada para la fase 2 (Clinicaltrials.gov: NCT01837667).

Materiales y métodos

Los pacientes aptos eran de 18 años o mayores con tumores sólidos progresivos comprobados que habían fracasado en tratamientos estándar. Los pacientes debían tener una esperanza de vida de al menos 12 semanas, un estado funcional ECOG de 0 o 1, y ser capaces de dar su consentimiento informado. Antes de la participación, los pacientes deben haberse recuperado de la toxicidad basal o inferior a grado 1 de tratamientos previos, tener una médula ósea adecuada (un recuento absoluto de neutrófilos $>1,5 \times 10^9/L$ y un recuento de plaquetas $>100 \times 10^9/L$); riñón (creatinina sérica $<1,2 \text{ mg/dL}$ y si es $>1,2 \text{ mg/dL}$, depuración de creatinina [método de Cockcroft-Gault] $>60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$); y función hepática (bilirrubina plasmática total $<1,5 \text{ mg/dL}$, alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) $<2,5$ veces el límite superior de lo normal). No deben tener ninguna otra enfermedad sistémica incontrolada. Las mujeres en edad fértil debían tener un resultado negativo en la prueba de embarazo en suero u orina.

Diseño de estudio y tratamiento

Se realizó un estudio abierto de fase I de escalado de dosis para evaluar la seguridad, tolerabilidad y actividad de LB-100 administrado durante 3 días consecutivos cada 3 semanas. Se planificaron estudios farmacocinéticos a la dosis máxima tolerable (MTD). La dosis inicial, 0,25 mg/m², 1/15 de la dosis más alta no gravemente tóxica en perros y el plan de escalado de dosis se especificaron por la FDA. El estudio fue aprobado por el comité de investigación en humanos de cada centro de estudio y está registrado en clinicaltrials.gov: NCT01837667.

LB-100 se suministró como solución de un único uso. Inicialmente, se administró LB-100 en 50 mL de solución salina durante 15 minutos. Debido a un aumento reversible no limitante de creatinina sérica al nivel de 2,33 mg/m², posteriormente se administró LB-100 en solución salina normal de 500 mL durante 2 horas. Se prohibió el escalado de dosis en cualquier grupo. Los pacientes eran aptos para recibir hasta 6 ciclos de terapia de estudio, a menos que la toxicidad inaceptable, la progresión de la enfermedad o la enfermedad intercurrente requirieran la interrupción. Se permitieron más de 6 ciclos en ausencia de progresión y toxicidad. Debido a la toxicidad cardíaca y renal a dosis elevadas en estudios toxicológicos con animales, los pacientes se sometieron a un seguimiento exhaustivo que incluía ECG, MUGA o ecocardiograma, troponinas cardíacas y BNP antes de cada ciclo. Se monitorizaron química sanguínea, análisis de orina, perfil hematológico y signos vitales antes y durante los días 1, 3, 8, 15, y 22 de cada ciclo. Los parámetros de laboratorio se tabularon según el grado máximo de gravedad de NCI-CTCAE (versión 4.0). Un comité de revisión de seguridad evaluó todos los datos clínicos cada 2 semanas y aprobó el escalado de la dosis entre grupos.

Evaluación de toxicidad y actividad clínica

Las dosis de LB-100 se escalonaron en grupos de tres pacientes. El primer paciente con un nuevo nivel de dosis fue observado durante tres semanas antes de tratar a los dos siguientes con esa dosis. Cuando se produjo una DLT potencial, se ingresaron tres nuevos pacientes con esa dosis. Si se producía otra DLT, se trataron tres pacientes adicionales con la dosis previa sin DLT para determinar la seguridad de ese nivel para los ensayos de fase 2.

La respuesta al tratamiento se evaluó mediante RECIST versión 1.1. Se evaluó la eficacia en todos los pacientes con enfermedad mensurable, que completaron 2 ciclos de LB-100 y se sometieron al menos a 1 evaluación tumoral postbasal. Se evaluó la seguridad en los pacientes que recibieron LB-100. La gravedad de los efectos adversos y las anomalías de laboratorio se notifica de acuerdo con NCI-CTCAE versión 4.0 y se codifica con el Diccionario Médico de Actividades Regulatorias.

Consecuencias

El objetivo principal era determinar la seguridad, tolerabilidad y dosis máxima tolerada de LB-100 administrada diariamente por vía intravenosa durante tres días consecutivos cada 3 semanas. Los objetivos secundarios eran documentar cualquier evidencia de actividad antitumoral potencial y obtener datos farmacocinéticos sobre LB-100 y un metabolito, endothall, en pacientes que recibieron LB-100 en el MTD (Quang et al., 2016).

Resultados:

Hubo 29 entradas de pacientes en 7 escalados de dosis. Un paciente interrumpió el tratamiento después de una dosis debido a una infección aguda y se volvió a inscribir después de la recuperación. Ambos cursos se analizaron como entradas de pacientes separadas. Dos pacientes presentaban toxicidad limitante (aumentos reversibles de creatinina sérica o depuración calculada de creatinina sérica) al nivel de 3,1 mg/m². Los eventos adversos probables o posibles de grado 3 relacionados con el fármaco de estudio se produjeron en 6 pacientes (20,7 %) [anemia (n=2), disminución de depuración de creatinina, disnea, hiponatremia, linfopenia]. Diez (50 %) de 20 pacientes evaluables de respuesta tuvieron enfermedad estable durante 4 o más ciclos. Un paciente con carcinoma pancreático tuvo una respuesta parcial observada después de 10 ciclos que se mantuvo durante 5 ciclos adicionales. Los demás pacientes que alcanzaron una enfermedad estable tenían uno de los siguientes síntomas: fibrosarcoma, condrosarcoma, tiroma, carcinoide atípico de pulmón u ovario, testículo, cáncer de mama (n=2) y cáncer de próstata. La dosis recomendada de fase 2 de LB-100 es 2,33 mg/m² diariamente durante 3 días cada 3 semanas.

Características del paciente

Se inscribieron veintiocho pacientes con tumores sólidos avanzados en cuatro centros clínicos. Sus características demográficas se enumeran en la Tabla 1. No se pudo evaluar la toxicidad en cuatro pacientes. Tres de estos pacientes tuvieron complicaciones asociadas a la enfermedad antes de completar el ciclo 1. Un cuarto paciente con carcinoide atípico de pulmón fue retirado del estudio después de una dosis de LB-100 debido a una infección aguda; fue reingresado en el estudio 7 semanas después y alcanzó una enfermedad estable durante 5 ciclos. Ambos cursos fueron incluidos en los análisis. Ninguno de estos eventos se consideró relacionado con la administración de fármaco.

Población de estudio (n = 28)	
Sexo	
Masculino	14 (50,0 %)
Femenino	14 (50,0 %)
Origen Étnico	
Blanco	23 (82,1 %)
Asiático	3 (10,7 %)
No notificado	1 (3,6 %)
Otros	1 (3,6 %)
Edad (años)	
N	28
Media	62,3
Desviación estándar	10,66
Mediana	64,0
Mínima	35
Máxima	79
18 a 64	15 (55,6 %)
65 +	13 (46,4 %)
Sitio Primario	
PULMÓN Y BRONQUIOS	5 (17,9 %)
INTESTINO GRUESO (EXC. APÉNDICE)	5 (17,9 %)
MAMA	2 (7,1 %)
TEJIDO CONECTIVO Y BLANDO	2 (7,1 %)
OVARIO	2 (7,1 %)
TESTÍCULO	2 (7,1 %)
APÉNDICE	1 (3,6 %)
HUESOS Y ARTICULACIONES	1 (3,6 %)
CUERPO UTERINO	1 (3,6 %)
PANCREAS	1 (3,6 %)
GLÁNDULA PROSTÁTICA	1 (3,6 %)
RECTO	1 (3,6 %)
INTESTINO DELGADO	1 (3,6 %)
TIMO	1 (3,6 %)
ÚTERO, NE	1 (3,6 %)
VULVA, NE	1 (3,6 %)

Tabla 1 : Características Clínicas y Demográficas Basales del Paciente

Escalado de dosis y toxicidad

- 5 Veinticuatro pacientes completaron al menos un ciclo de 3 días de LB-100. Las dosis probadas eran 0,25, 0,50, 0,83, 1,25, 1,75, 2,33 y 3,1 mg/m². No hubo DLT durante los 6 primeros niveles de dosis. Al nivel de dosis de 3,1 mg/m², un paciente con cáncer de próstata y otro con condrosarcoma no presentaron DLT durante 4 y 9 ciclos de tratamiento, respectivamente. Una tercera paciente con cáncer de ovario tuvo un aumento de grado 3 en la depuración de creatinina calculado después del ciclo 1 con un retorno a la normalidad en el día 8 y recibió 3 ciclos más a una dosis
- 10 reducida de 2,33 mg/m² antes de la progresión tumoral. Un cuarto paciente con fibrosarcoma tuvo un aumento de grado 3 en la depuración de creatinina calculado después del primer curso. La creatinina volvió al valor previo al tratamiento en el día 21 y un segundo curso a 2,33 mg/m² dio lugar a un aumento de grado 2 en la depuración de

creatinina sin otra toxicidad. La dosis se redujo a 1,75 mg/m² y se administraron diez ciclos más sin toxicidad hasta progresión después de 36 semanas. Ya que 2/4 pacientes con 3,1 mg/m² tuvieron aumentos de grado 3 en la depuración de creatinina durante el primer ciclo, se evaluaron tres pacientes adicionales con el nivel de dosis precedente de 2,33 mg/m². No tenían toxicidad limitante, estableciéndose de este modo la MTD a ese nivel. No hubo toxicidad sintomática diferente a fatiga reversible leve a moderada. Los eventos adversos relacionados posiblemente con la administración de fármaco se enumeran en la Tabla 2.

5

Plazo Preferido MedDRA [1][2]	Grado 1-2	Grado 3	Grado 4	Grado 5
Total de Pacientes con Eventos Adversos Emergentes del Tratamiento [3]	22 (73,9 %)	6 (20,7 %)	0	0
FATIGA	8 (27,6 %)	0	0	0
AUMENTO DE CREATININA EN SANGRE	5 (17,2 %)	0	0	0
AUMENTO DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASA	4 (13,8 %)	0	0	0
DOLOR DE CABEZA	3 (10,3 %)	0	0	0
HIPERNATREMIA	3 (10,3 %)	0	0	0
HIPOTALBUMINEMIA	3 (10,3 %)	0	0	0
NAUSEA	3 (10,3 %)	0	0	0
PROTEINURIA	3 (10,3 %)	0	0	0
PIREXIA	3 (10,3 %)	0	0	0
AUMENTO DE ALANINA AMINOTRANSFERASA	2 (6,9 %)	0	0	0
ESTREÑIMIENTO	2 (6,9 %)	0	0	0
NEUROPATÍA PERIFÉRICA	2 (6,9 %)	0	0	0
EDEMA PERIFÉRICO	2 (6,9 %)	0	0	0
TAQUICARDIA SINUSAL	2 (6,9 %)	0	0	0
MOLESTIA ABDOMINAL	1 (3,4 %)	0	0	0
DISTENSIÓN ABDOMINAL	1 (3,4 %)	0	0	0
HIPERTENSIÓN ACCELERADA	1 (3,4 %)	0	0	0
ANEMIA	1 (3,4 %)	2 (6,9 %)	0	0
ARTRALGIA	1 (3,4 %)	0	0	0
AUMENTO DE FOSFATASA ALCALINA EN SANGRE	1 (3,4 %)	0	0	0
AUMENTO DE UREA EN SANGRE	1 (3,4 %)	0	0	0
CANDIDIASIS	1 (3,4 %)	0	0	0
DOLOR DE PECHO	1 (3,4 %)	0	0	0
ESCALOFRÍOS	1 (3,4 %)	0	0	0
DISMINUCIÓN DEL APETITO	1 (3,4 %)	0	0	0
DERMATITIS ACNEIFORME	1 (3,4 %)	0	0	0
DIARREA	1 (3,4 %)	0	0	0
MARHO	1 (3,4 %)	0	0	0
DISMINUCIÓN DE LA FRACCIÓN DE EYECCIÓN	1 (3,4 %)	0	0	0
ELECTROCARDIOGRAMA QT PROLONGADO	1 (3,4 %)	0	0	0
ALTERACIÓN DE LA MARCHA	1 (3,4 %)	0	0	0
TRASTORNO GASTROINTESTINAL	1 (3,4 %)	0	0	0
EDEMA GENERALIZADO	1 (3,4 %)	0	0	0
DOLOR GINGIVAL	1 (3,4 %)	0	0	0
HIPERCALCEMIA	1 (3,4 %)	0	0	0
HIPERCALÉMIA	1 (3,4 %)	0	0	0
HIPERTENSIÓN	1 (3,4 %)	0	0	0
HIPOESTESIA	1 (3,4 %)	0	0	0
HIPOKINESIA	1 (3,4 %)	0	0	0
HIPOTENSIÓN	1 (3,4 %)	0	0	0
HIPOXIA	1 (3,4 %)	0	0	0
INSOMNIO	1 (3,4 %)	0	0	0
INFLAMACIÓN MUCOSA	1 (3,4 %)	0	0	0
FASCICULACIONES MUSCULARES	1 (3,4 %)	0	0	0
DEBILIDAD MUSCULAR	1 (3,4 %)	0	0	0
NEUTROPENIA	1 (3,4 %)	0	0	0
EDEMA	1 (3,4 %)	0	0	0
DOLOR DE BIEL	1 (3,4 %)	0	0	0
FRIALDAD PERIFÉRICA	1 (3,4 %)	0	0	0
NEUROPATÍA SENSORIAL PERIFÉRICA	1 (3,4 %)	0	0	0
DISMINUCIÓN DEL RECuento DE PLAQUETAS	1 (3,4 %)	0	0	0
DERRAME PLEURAL	1 (3,4 %)	0	0	0
TAQUIPNOEA	1 (3,4 %)	0	0	0
TEMBLOR	1 (3,4 %)	0	0	0
VÓMITO	1 (3,4 %)	0	0	0
DISMINUCIÓN DE PESO	1 (3,4 %)	0	0	0
DEPURACIÓN RENAL DE CREATININA	0	1 (3,4 %)	0	0
DISNEA	0	1 (3,4 %)	0	0
HIPONATREMIA	0	1 (3,4 %)	0	0
DISMINUCIÓN DEL RECuento DE LINFOCITOS	0	1 (3,4 %)	0	0

[1] Número de Pacientes utilizados como denominador para calcular porcentajes.
[2] Pacientes con múltiples TEAE se cuentan una vez dentro de un plazo preferido.
[3] Eventos Adversos emergentes del tratamiento (TEAE) se definen como todos los AE que se producen después de la primera dosis de medicación de estudio o en el periodo posttratamiento de 30 días.

Tabla 2 : Efectos Adversos en la Población de Seguridad

Farmacocinética

Se midieron las concentraciones plasmáticas de LB-100 y endothall (Quang et al., 2016) antes y más de 4 horas después de completar la infusión de 2 horas a la MTD de 2,33 mg/m² de LB-100 en el día 1 en un paciente y en los días 1 y 3 en dos pacientes. La farmacocinética de LB-100 era similar en los días 1 y 3 y se caracterizó por una depuración baja, un volumen de distribución bajo y una vida media corta. Las concentraciones plasmáticas de endothall eran bajas durante toda la infusión, estando por debajo del límite inferior de detección (5 ng/mL) en un paciente. En los otros dos pacientes, se observó la concentración máxima de endothall (34,7 ng/mL) en el último momento de muestreo (4 h), lo que impidió determinar su vida media de eliminación (Tabla 3).

LB-100								
Grupo de sujetos	Día nominal	Sujeto	Género	Dosis (mg/m ²)	CL ^a aparente (ng*h/mL)	V ^b aparente (ng*h/mL)	T _{1/2} (h)	
1	1	001-0030	Masculino	2,33	2,5	0,52	1,10	
	3			2,33	5,7	1,10	0,95	
1	1	002-0028	Femenino	2,33	2,7	0,65	1,35	
	3			2,33	2,0	0,47	1,56	
1	1	003-0029	Femenino	2,33	4,7	1,06	1,58	

^a El valor de depuración y ^b el volumen de distribución en estado estable representa una aproximación, ya que el perfil de concentración plasmática-tiempo solo se caracterizó hasta 4 horas después de finalizar la infusión.

Endothall								
Grupo de sujetos	Día nominal	Sujeto	Género	Dosis (mg/m ²)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	T _{1/2} (h)	AUC (ng*h/mL)
1	1	001-0030	Masculino	2,33	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
	3			2,33	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
1	1	002-0028	Femenino	2,33	11,5	4	ND ^b	22
	3			2,33	34,3	4	ND ^b	143
1	1	003-0029	Femenino	2,33	14,8	4	ND ^b	28

^a Las concentraciones plasmáticas de endothall estaban por debajo del límite inferior de cuantificación (5 ng/mL)

^b No fue posible definir la vida media de eliminación terminal ni los valores de ^aAUC.

Tabla 3: Parámetros farmacocinéticos de LB-100 y endothall

Evaluación de actividad clínica

De 20 pacientes con enfermedad mensurable, un paciente con cáncer pancreático tuvo una respuesta parcial, observada después de 10 ciclos y con una duración de 5 ciclos más, y 16 pacientes no presentaron progresión de su(s) lesión(es) indicadoras. Se retiraron del estudio por la aparición de una nueva lesión o por los síntomas que se consideraron representativos de la progresión clínica. Solo 3 pacientes, uno con adenocarcinomas duodenales y dos con adenocarcinomas colónicos, presentaron aumentos significativos en el tamaño de su(s) lesión(es) indicadoras según los criterios de RECIST (Figura 1).

La consecución de una respuesta parcial de estabilidad de enfermedad no era claramente dependiente de la dosis, ya que se produjo a 0,83 mg/m² en cáncer pancreático (15 ciclos) y en carcinoide atípico de pulmón (5 ciclos); a 1,25 mg/m² en cáncer de mama (4 ciclos) y cáncer testicular (5 ciclos); y a 1,75 mg/m² en timoma maligno (8 ciclos) y cáncer de ovario (6 ciclos). A 3,1 mg/m², un paciente con condrosarcoma era estable durante 8 ciclos de LB-100 sin ninguna alteración de la función renal normal, mientras que un paciente con fibrosarcoma iniciado con 3,1 mg/m² era estable durante 12 ciclos después de dos reducciones de dosis (Figura 2).

Conclusiones: la seguridad, tolerabilidad, evidencia preliminar de actividad antitumoral y nuevo mecanismo de acción de LB-100 apoyan su desarrollo continuo por separado y en combinación con otras terapias.

DISCUSIÓN (Ejemplo 6)

Se determinó la MTD of LB-100, un potente inhibidor de PP2A, en pacientes con tumores sólidos. La dosis inicial recomendada para la fase 2 es 2,33 mg/m² diariamente durante 3 días cada 3 semanas con escalado a 3,1 mg/m² en ausencia de toxicidad renal y un desescalado a 1,75 mg/m² o inferior para la toxicidad renal en caso de enfermedad estable o en regresión. Dado que los pacientes tenían estabilidad de la enfermedad y un paciente con cáncer pancreático tenía regresión objetiva a dosis tan bajas como 0,83 mg/m² diariamente durante 3 días cada 3 semanas, es posible que la actividad anticancerígena óptima en humanos sea considerablemente menor que la MTD.

Diez (50 %) de 20 pacientes que recibieron al menos 2 ciclos de LB-100 tuvieron enfermedad estable durante un máximo de 15 ciclos de terapia sin toxicidad limitante o acumulativa. El mecanismo subyacente de este fenómeno no está claro. La actividad de PP2A es afectada o potenciada en muchos tipos de cáncer por mutación o por aumento de la expresión de uno o más de diversos inhibidores endógenos de PP2A (Chang et al., 2015; Perotti et al., 2013; Seshacharyulu et al., 2013; Sangodkar et al., 2016). Ya que el único paciente con cáncer pancreático en el presente estudio tuvo una respuesta objetiva y una enfermedad estable durante más de 11 meses, es de especial interés que recientemente se haya informado de una marcada sobreexpresión de una subunidad reguladora de PP2A asociada a hiperactividad de PP2A en la mayoría de los cánceres pancreáticos humanos (Hein et al., 2016). La desactivación de esta subunidad, PR55 α , en una línea celular pancreática humana implantada ortotópicamente en ratones desnudos, redujo significativamente su tumorigénesis y potencia metastática (Hein et al., 2016).

Por otro lado, sin querer vincularse a una teoría específica, los déficits adquiridos en la actividad de PP2A pueden hacer que los tumores sean selectivamente vulnerables a una mayor inhibición farmacológica de PP2A. Por ejemplo, en el síndrome mielodisplásico (MDS) del(5q), se elimina un alelo de la subunidad catalítica de PP2A (Sallman et al., 2014). Se informó de que la lenalidomida, el agente estándar para el tratamiento de MDS, es selectivamente citotóxica para estas células de MDS del(5q) haploinsuficientes en PP2A en virtud de su moderada actividad inhibitoria de PP2A (Sallman et al., 2014). La inhibición de PP2A también da lugar a una letalidad sintética de células cancerosas que sobreexpresan Mad2 (proteína de deficiencia de detención mitótica 2) que se produce en coordinación con mutaciones en las vías Rb y/o p53 (Bian et al., 2014; Schvartman et al., 2011). En el presente estudio, el cáncer pancreático del paciente con una respuesta parcial sobreexpresó marcadamente Mad2.

Otro mecanismo potencial por el cual el agente único LB-100 puede inhibir la progresión del cáncer es la potenciación de la función de las células T citotóxicas. Sin querer vincularse a una teoría específica, la actividad de fosfatasa de PP2A es importante para la activación de las células T mediada por CTLA-4 (Teft et al., 2009) y esencial para la función reguladora de células T (Apostolidis et al., 2016). Además, la inhibición de Ppp2r2d, una subunidad reguladora de PP2A, potencia la proliferación de células T y la producción de citocinas mediante un mecanismo distinto al de los reguladores negativos conocidos de la función de las células T (Zhou et al., 2014). Sin embargo, en el presente estudio, ningún paciente experimentó toxicidades sugestivas de la actividad autoinmune que se produce con los compuestos actualmente aprobados que inducen el bloqueo de puntos de control inmunitarios.

La disponibilidad de un inhibidor de PP2A clínicamente seguro ofrece una oportunidad de explotar un objetivo terapéutico apreciado durante mucho tiempo pero descuidado para la terapia del cáncer. El ensayo actual sugiere que LB-100 por separado tiene actividad anticancerígena. Sin embargo, la inhibición farmacológica de PP2A es probablemente más eficaz para la terapia del cáncer cuando se combina con fármacos citotóxicos, particularmente para tumores con anomalías adquiridas en la función de PP2A y/o en la vía de reparación de daños en el ADN (Zhuang et al., 2009; Hong et al., 2015) y/o con otros tipos de inhibidores de puntos de control inmunitarios.

Ejemplo 7. Administración de LB-100 en una combinación

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con una terapia anticancerígena a un sujeto afectado por cáncer. La cantidad de compuesto y terapia anticancerígena es efectiva para tratar al sujeto.

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con una terapia anticancerígena a un sujeto afectado por cáncer. La cantidad de compuesto es efectiva para potenciar la actividad anticancerígena respecto a la terapia anticancerígena por separado.

Ejemplo 8. PP2A y PD-1

La inhibición farmacológica de PP2A podría mejorar la activación inmunitaria y la inmunoterapia del cáncer. La inhibición de PP2A debería potenciar la inmunoterapia del cáncer al aumentar directamente la proliferación de células T CD4 y CD8 convencionales y al perjudicar la función inmunosupresora de Tregs. Se planteó la hipótesis de que LB-100 podría aumentar el efecto del bloqueo de puntos de control inmunitarios. Este es el primer estudio que demuestra en un modelo preclínico que la inhibición farmacológica de PP2A podría ser sinérgica con la inmunoterapia.

Se evaluó el efecto de LB-100 sobre células T en reacciones alogénicas de linfocitos mixtos humanos, en las que las células T CD8+ o CD4+ se cocultivaron con células dendríticas autólogas derivadas de monocitos. Se encontró un aumento dependiente de la dosis en la proliferación de células T en células CD8+ y CD4+ (Figs. 4A-B y 5A-B) y un aumento en la secreción de IFN γ en células T CD4+ (Figs 3A-B). Se encontró que un aumento dependiente de la dosis potencia la expresión de la molécula coestimuladora OX40 en células T (Figs. 6A-B) y Tbet, factor de transcripción para impulsar la producción de IFN γ en células T CD4+ (Figs 7A-B). En el mismo ensayo se investigó el efecto de LB-100 más anti-PD-1 en células T CD4+. La combinación potenció la proliferación (Figs.8A-B, 9A-D), la expresión de OX40 (Figs. 10A-B), la expresión de Tbet (Figs. 11A-B), y la producción de IFN γ en comparación con anti-PD-1 por separado (Figura 15).

Ejemplo 9. La inhibición de LB-100 y los bloqueos de PD-1 provocan un rechazo tumoral duradero mediado por células T CD8+

Para probar la hipótesis de que la inhibición de PP2A con LB-100 puede potenciar las respuestas antitumorales mediadas por el sistema inmunitario, se implantaron células tumorales CT26 en ratones. CT26 es un adenocarcinoma de colon murino que expresa un nivel bajo de PD-L1 y es resistente a la terapia anti-PD1. Después de alrededor de 13 días, los ratones con un tamaño de tumor entre 30-100 mm³ se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento (control de PBS, LB-100 por separado - 0,16 mg/kg, anti-PD-1 por separado - 10 mg/kg, o una combinación de ambos). El tratamiento se administró cada 2 días durante un total de 28 días. Se evaluó el tamaño del tumor cada dos días (Figs. 20A-C). El tratamiento con anti-PD1 como agente único no fue efectivo en la reducción de la carga tumoral o el aumento de la supervivencia. LB-100 por separado fue capaz de aumentar la mediana de supervivencia de 21 a 33 días (p=0,02). El tratamiento combinado disminuyó significativamente el volumen tumoral medio en 70 % en comparación con el control (p<0,01) en el día 14 después del tratamiento. La mediana de supervivencia también aumentó de 21 a 72 días (p<0,01). Lo más sorprendente es que el 50 % de los ratones alcanzaron una regresión completa (CR) de tumores sin evidencia de enfermedad. Esta respuesta fue duradera después de completar el tratamiento.

A continuación se examinó si los ratones que alcanzaron CR a partir de la terapia combinada desarrollaron memoria inmunitaria a largo plazo. Alrededor de 60 días después de la inoculación inicial, los ratones curados se reinocularon con las mismas células CT26 (Figs. 21A-B). Ninguno de los ratones (n=8) desarrolló tumor en la reexposición. Al mismo tiempo se inocularon ratones sin tratamiento con CT26 para que sirvieran como control. Este resultado indica que los ratones curados mediante la terapia combinada eran capaces de establecer memoria a largo plazo del antígeno específico tumoral.

A continuación se exploró si el efecto sinérgico de LB-100 con anti-PD-1 que dio lugar a la regresión tumoral está mediado por células T CD8. Los ratones portadores de tumores CT26 se sometieron a ablación con CD8 utilizando antibióticos depletantes antes del inicio del tratamiento. La ablación de células T CD8+ se confirmó con FACS de esplenocitos 3 días después del tratamiento. Con CD8 depletado, la terapia combinada no consiguió provocar una respuesta antitumoral. El 0 % de ratones depletados de CD8+ que recibieron la combinación alcanzaron CR en comparación con el 72% en el grupo no depletado de CD8+ (Figs. 22A-C). Conjuntamente, estos resultados demostraron que el efecto de LB-100 está mediado por el sistema inmunitario en lugar de un efecto citotóxico directo sobre el tumor.

Métodos

Reactivos - LB-100 fue proporcionado por Lixte Biotechnology. El anticuerpo anti-ratón PD-1, clon RMP1-14, se adquirió en BioXcell. Para la citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mAbs): anti-ratón en rata CD4-BV421, anti-ratón en rata CD3-PE, anti-ratón en rata CD8a-Alexa 647, anti-ratón en rata CD45-BV785, anti-ratón en rata IFNg-FITC, anti-ratón en rata FOXP3-Alexa 647. Estos anticuerpos se adquirieron en Biolegend.

Líneas celulares y ratones - CT26. La línea de carcinoma de colon CL25 se obtuvo en ATCC. Se cultivaron células tumorales en medio completo (RPMI 1640; Cellgro) que contenía 10 % (vol/vol) de FBS (Thermofisher), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (Gibco). Se adquirieron hembras BALB/c de seis a 8 semanas de edad en Charles River. Los ratones se alojaron en el Centro de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (Bethesda, MD). Todos los experimentos fueron aprobados por la Oficina de Cuidado y Uso de Animales de los Institutos Nacionales de Salud y se llevaron a cabo de acuerdo con los Institutos Nacionales de Salud.

Inoculación tumoral y estudios en animales - Se inyectaron células tumorales CT26 ($0,5 \times 10^6$) por vía subcutánea en el lado derecho del abdomen. Se inyectaron LB-100 y anti-PD-1 por ruta i.p. a una dosis de 0,16 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente a partir del día 11 después de la implantación del tumor y continuaron cada 2 días durante 28 días. Se monitorizó el tamaño del tumor con un calibrador digital cada 2-3 días y se expresó como volumen (longitud x anchura² x 0,5). Se sometieron a eutanasia los animales cuyos tumores se ulceraron/necrotizaron o con una carga tumoral superior a 2.000 mm³ o con un diámetro máximo superior a 2 cm.

Depleción de células T CD8. Se inyectaron mAbs anti-CD8 (clon 53.6.7) (BioXcell) 2 días y 1 día antes de la terapia, en el día de la terapia y a los 5 y 8 días después del inicio de la terapia. La dosis era 0,1 mg por inyección.

Estudios de reexposición tumoral. Se inocularon con células CT26 ratones sin tratamiento con BALB/c y ratones previamente curados con tratamiento combinado como se describe anteriormente en el flanco torácico izquierdo (no inoculado previamente). Los tumores se midieron dos veces por semana como se describió anteriormente. Se sometieron a eutanasia los animales cuyos tumores se ulceraron/necrotizaron o con una carga tumoral superior a 2.000 mm³ o con un diámetro máximo superior a 2 cm.

Ejemplo 10. Los bloqueos de LB-100 y PD-1 regulan linfocitos infiltrantes tumorales (TIL)

Se evaluó el efecto del tratamiento sobre los linfocitos infiltrantes tumorales (Figs. 23A-B). Se trataron ratones portadores de tumores CT26 con LB-100 y/o anticuerpos anti-PD-1 como anteriormente. Después de 12 días de

tratamiento, los tumores se analizaron por FACS. Las células T CD8+ infiltrantes tumorales de ratones tratados con LB-100 y anticuerpo anti-PD-1 mostraron un aumento significativo de células IFN γ +CD8+ T en comparación con células de animales de control y animales tratados con anti-PD-1 por separado (25,3 % en comparación con 11,0 % y 10,5 % respectivamente, $p=0,05$). Dado que IPN γ es la respuesta antitumoral mediadora de citocinas más crítica, este resultado es una confirmación funcional de que los ratones sometidos a tratamiento combinado tienen inmunidad potenciada contra los tumores implantados. Además, dada la importancia conocida de PP2A en Treg, se examinó el efecto del tratamiento con LB-100 y/o anti-PD-1 en la cantidad de Tregs presentes en el tumor. LB-100 por separado depletó significativamente Tregs en el entorno tumoral (2,1 % en comparación con 14,7 % en el control). Este efecto es similar al grado de efecto sobre la depleción de Tregs por anti-PD-1 o la combinación. El hecho de que LB-100 por separado pueda depletar Tregs sugiere un posible mecanismo que explica el pequeño pero significativo beneficio de supervivencia observado en el grupo de tratamiento con LB-100 por separado.

Además, los ratones que alcanzaron CR eran resistentes al crecimiento de tumores al ser reinoculados con células CT26. Los ratones sometidos a ablación de células T CD8+ utilizando anticuerpos depletantes no fueron capaces de rechazar los tumores CT26 - 0/8 (0 %) a pesar del tratamiento con terapia combinada, lo que indica que el efecto antitumoral de LB-100 con tratamiento con anti-PD-1 está mediado por células T CD8+. En conclusión, en un modelo animal singénico, el inhibidor de PP2A, LB-100, tiene potencial sinérgico junto con el bloqueo de puntos de control que apoya la investigación de su capacidad de potenciar la inmunoterapia en la clínica.

En resumen, en este modelo preclínico se ha demostrado que LB-100, cuando se combina con anti-PD-1, tiene un efecto robusto y sinérgico que da como resultado una regresión completa de una parte significativa de los ratones tratados. Este efecto está mediado por la inmunidad adaptativa a través de células T CD8+. También hay el establecimiento de memoria inmunitaria asociada a la regresión del tumor. Este es el primer informe sobre el uso de la inhibición farmacológica de PP2A como objetivo para potenciar la inmunoterapia.

Los tumores desarrollaron frecuentemente múltiples mecanismos para evadir el sistema inmunitario, uno de los cuales es la expresión de PD-1 de células T, que inhibe de forma efectiva que las células T ataquen el tumor. Anti-PD-1 anula esta señal inhibitoria, lo que permite que la célula T reconozca y erradique el tumor. Se descubrió que LB-100, un inhibidor de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), tiene un efecto antitumoral drástico en un modelo preclínico de cáncer de colon. Se descubrió que este efecto estaba mediado por la mejora del sistema inmunitario.

Ejemplo 11. Administración de LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control PD-1 y/o PD-L1

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control PD-1 y/o PD-L1 a un sujeto afectado por cáncer. La cantidad de compuesto e inhibidor es efectiva para tratar al sujeto.

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control PD-1 y/o PD-L1 a un sujeto afectado por cáncer. La cantidad de compuesto es efectiva para potenciar la actividad anticancerígena del inhibidor de puntos de control PD-1 y/o PD-L1.

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control PD-1 y/o PD-L1 a un sujeto afectado por melanoma. La cantidad de compuesto e inhibidor es efectiva para tratar al sujeto.

Se administra una cantidad de compuesto LB-100 en combinación con un inhibidor de puntos de control PD-1 y/o PD-L1 a un sujeto afectado por melanoma. La cantidad de compuesto es efectiva para potenciar la actividad anticancerígena del inhibidor de puntos de control PD-1 y/o PD-L1.

Ejemplo 12: Evaluación de la eficacia de LB-100 como terapia complementaria a atezolizumab, nivolumab o pembrolizumab.

La terapia complementaria proporciona un efecto sinérgico y permite dosis más bajas con efectos secundarios reducidos.

La administración periódica de LB-100 como terapia complementaria para un paciente humano afectado por melanoma que ya está recibiendo atezolizumab, nivolumab o pembrolizumab proporciona una ventaja clínicamente significativa y es más efectiva (proporciona al menos un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en el tratamiento del paciente que cuando se administra solo atezolizumab, nivolumab o pembrolizumab (en la misma dosis).

La administración periódica de atezolizumab, nivolumab o pembrolizumab como terapia complementaria para un paciente humano afectado por melanoma que ya está recibiendo LB-100 proporciona una ventaja clínicamente significativa y es más efectiva (proporciona al menos un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en el tratamiento del paciente que cuando se administra solo LB-100 (en la misma dosis).

Las terapias complementarias también proporcionan eficacia (proporcionan al menos un efecto aditivo o más de un efecto aditivo) en el tratamiento del paciente sin efectos secundarios adversos indebidos o que afecten la seguridad del tratamiento. En comparación con la administración de cada agente por separado:

1. La terapia complementaria es más efectiva (proporciona un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en el aumento de la cantidad de células T citotóxicas en pacientes con melanoma;

2. La terapia complementaria es más efectiva (proporciona un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en la ralentización de la progresión del melanoma en pacientes con melanoma; y/o

3. La terapia complementaria es más efectiva (proporciona un efecto aditivo o más que un efecto aditivo) en la reducción de la función de PD-1 y/o PD-L1 en los pacientes con melanoma.

Ejemplo 13: la inhibición farmacológica de la proteína fosfatasa-2A con LB-100 alcanza una actividad antitumoral mediada por el sistema inmunitario duradero cuando se combina con el bloqueo de PD-1

El presente ejemplo demuestra, entre otras cosas, que un inhibidor de PP2A de molécula pequeña, LB-100, cuando se combina con el bloqueo de anti-PD1 (aPD-1) provoca sinérgicamente una respuesta antitumoral mediada por el sistema inmunitario duradero en el modelo de cáncer de colon CT26. Este efecto era dependiente de las células T, lo que llevó a una regresión sorprendente a una proporción significativa de tumores. El análisis de los linfocitos tumorales demostró una infiltración potenciada de células T efectoras y una depleción de células T reguladoras supresoras, lo que dio lugar a un marcado aumento en la proporción de células T efectoras respecto a reguladoras. La depuración del tumor estableció la inmunidad protectora secundaria específica del antígeno. También se observó un efecto sinérgico del bloqueo de LB-100 y aPD-1 en el modelo de melanoma B16. Además, en el presente documento se describe el hallazgo de que LB-100 activó específicamente la vía de señalización mTORC1, lo que dio como resultado una disminución de la diferenciación de la expresión de células CD4 sin tratamiento en células T reguladoras. También se encontró un aumento de la expresión de Th1 y una disminución de la expresión de citocinas Th2. Estos datos ponen de relieve el potencial traslacional de la inhibición de PP2A en combinación con la inhibición de puntos de control.

El tratamiento combinado de LB-100 y aPD-1 provoca sinérgicamente el rechazo de tumores CT26: para probar la hipótesis de que la inhibición de PP2A tiene un efecto sinérgico con la terapia aPD-1 in vivo en tumores resistentes a aPD-1 se utilizó un tumor CT26, que es un carcinoma colorrectal murino con expresión elevada de PD-L1 pero respuesta limitada a la terapia con aPD-1. Los ratones se inocularon con células tumorales CT26 ($0,25 \times 10^6$). Después de 10-13 días, los ratones con tumores que alcanzaban un tamaño de 50-100 mm³ se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento: control (PBS), aPD-1, LB-100 y la combinación de aPD-1 y LB-100. Los tratamientos se administraron cada 2 días durante 30 días. Se evaluó el crecimiento del tumor cada 2 días (Fig.24A). En este modelo, LB-100 por separado no disminuyó significativamente el crecimiento tumoral, pero sí prolongó la mediana de supervivencia (33 frente a 21 días, $p = 0,02$). Además, aPD-1 por separado no tiene efecto en el crecimiento tumoral o la supervivencia. Sin embargo, la combinación de LB-100 y aPD-1 dio lugar a una regresión sorprendente de una parte significativa de los tumores, y el 50 % alcanzó una regresión completa (CR) durante la duración del estudio. Hubo una diferencia significativa en el tamaño del tumor en el día 8 después del tratamiento ($p \leq 0,05$) y un aumento significativo en la supervivencia ($p < 0,005$) entre las ramas de tratamiento combinado y de control (Fig.24B).

El efecto de la combinación de LB100 y aPD-1 es dependiente de las células T CD8: a continuación se examinó si el efecto sinérgico de la combinación de LB-100 y aPD-1 que dio lugar a una regresión tumoral duradera era un proceso mediado por el sistema inmunitario. Los ratones portadores de tumor CT26 se sometieron a ablación de células T CD8+ utilizando anticuerpos depletantes antes y durante el tratamiento con LB-100 y aPD-1 (Fig.24C). La depleción periférica de CD8+ se confirmó 5 días después del tratamiento con FACS (datos no mostrados). Cuando se depletó de células T CD8+, la combinación LB-100 y aPD-1 no provocó rechazo tumoral (0 frente a 72 %, $p = 0,0015$) (Fig.24D). El volumen tumoral medio se multiplicó por 13 a los 10 días del tratamiento en el grupo de combinación con depleción de CD8 en comparación con el volumen tumoral en el grupo no depletado (612 frente a 46 mm³, $p < 0,001$). La supervivencia también disminuyó significativamente con depleción de CD8 ($p < 0,0001$). La depleción de células T CD8 por separado tuvo un pequeño efecto deletéreo en comparación con el control tanto en el crecimiento tumoral como en la supervivencia, lo que sugiere que un nivel basal de inmunidad mediada por células T CD8+ sirvió para limitar el crecimiento de CT26 en condiciones basales. Estos datos indicaban que LB-100 con sinergia con aPD-1 es dependiente de la inmunidad adaptativa mediada por células T CD8+ y no de un efecto directo de la inhibición del crecimiento tumoral por PP2A.

Los ratones curados por terapia combinada desarrollan una memoria a largo plazo específica del antígeno: el sello distintivo de una respuesta inmunitaria adaptativa exitosa es el establecimiento de la memoria inmunológica. En el siguiente experimento se probaron ratones que habían experimentado una respuesta completa (CR) para su respuesta antitumoral protectora secundaria. Los ratones se expusieron de nuevo a células CT26 alrededor de 60 días después de la implantación tumoral inicial (Fig.25A). Estos ratones eran completamente resistentes a la reexposición a células CT26 (Fig.25B). El tamaño medio del tumor en el día 18 después del (re)implante era 480 mm³ en ratones sin tratamiento en comparación con 0 mm³ en ratones CR ($p < 0,0001$) (Fig.25C).

A continuación se probó si la respuesta inmunológica secundaria protectora era específica de los tumores CT26. Después de alrededor de 60 días desde la implantación inicial, los ratones CR se reexpusieron tanto a células CT26

en el flanco como a células 4T1, una línea celular de cáncer de mama murino no relacionada, en la almohadilla de grasa mamaria (Fig.25D). Los ratones con CR eran resistentes a células CT26 pero no a células 4T1. Dieciocho días después de la inoculación, no hubo diferencia en el volumen tumoral 4T1 entre los ratones sin tratamiento y los ratones CR, mientras que CT26 no creció en los ratones CR (Fig.25E-F). Este resultado indica que la respuesta de memoria secundaria es específica de los antígenos expresados por CT26.

Activación de linfocitos aumentada con tratamiento combinado: para abordar el mecanismo celular que media el rechazo tumoral por la combinación LB-100/aPD-1, se examinó el estado del sistema inmunitario en los órganos linfoides secundarios y en el tumor. Se implantaron tumores CT26 a los ratones y estos se trataron con LB-100 y/o aPD-1 como se describió anteriormente. En el día 3, después de dos tratamientos, se extrajeron los bazo, los ganglios linfáticos drenadores tumorales (dLN) y los tumores se recogieron y se analizaron mediante citometría de flujo (Fig.26-27). En el tejido linfático secundario se observó una mayor activación de células T CD8+ en ratones tratados con el régimen combinado en comparación con controles, como indica una mayor frecuencia de células T CD44+CD62L-CD8+ (Fig. 26A-C). En el bazo, el tratamiento con LB-100 por separado dio lugar a un pequeño aumento de células T CD44+CD62L-CD8+ (de 13,0 a 16,6 %, $p<0,05$) pero el tratamiento combinado dio lugar a un aumento mayor que LB-100 o aPD1 por separado (20,8 en comparación con 16,6 y 15,5 % respectivamente, $p<0,05$ y $p<0,005$) (Fig. 26B). Asimismo, las células T CD44+CD62L-CD8+ aumentaron en los dLN de ratones tratados con la combinación en comparación con el control (de 7,4 a 17,9 %, $p<0,05$) (Fig. 26C). No hubo diferencia en la frecuencia del subconjunto CD44+CD62L- en células T CD4+ tanto en el bazo como en los dLN (Fig. 28A y 29A). Se examinaron los marcadores de puntos de control inmunitarios, incluyendo la expresión de PD-1, CTLA4, TIM3 y Ox40 en células T CD8+ y CD4+ en el ganglio linfático y el bazo que drenan el tumor (Fig.28 y 29). No hubo diferencia en la expresión de estos marcadores, excepto por un aumento pequeño pero significativo en la expresión de PD-1 en la célula T CD4+ tratada con aPD-1 en los dLN; sin embargo, LB-100 por separado o en combinación no alteró adicionalmente la expresión de PD-1 (Fig. 29A).

A continuación se realizó un análisis exhaustivo de los linfocitos infiltrantes tumorales (Fig.26-27, 30). En primer lugar se examinó el porcentaje absoluto de células CD45+. No hubo diferencia significativa entre los grupos de tratamiento. Sin embargo, dentro de la población de CD45+ hubo un aumento significativo de células T CD3+ en el tratamiento combinado en comparación con el control (de 33,3 a 49,9 %, $p<0,05$) (Fig. 26E). Más importante aún, este aumento en la población de células T CD3+ se atribuyó a un aumento significativo de células T CD8+ (Fig.26D), ya sea normalizado a células CD45+ (de 25,9 a 45,3 %, $p \leq 0,01$) (Fig.26F) o al número de células residentes en el tumor (de 8 a 19 %, $p<0,05$) (Fig. 31A). Se observó una tendencia similar en células T CD8+ normalizadas al peso del tumor (Fig. 31B). En cambio, la población de células T CD4+ permaneció sin cambios (Fig.26G, 31), dando lugar a un marcado aumento en la relación CD8/CD4 (de 3,6 a 9,0, $p<0,001$) (Fig. 27H). Esto indicaba que la combinación LB-100/aPD-1 dio lugar a un aumento del tráfico de células T CD8+ al tumor, lo que ha demostrado ser uno de los predictores más importantes de la respuesta a la inmunoterapia. Además, se examinó la subpoblación de TILs CD8+ mediante el etiquetado del marcador fenotípico efector CD44+. Hubo un aumento significativo de células T CD8+CD44+ en ratones tratados con la combinación en relación con el control (9,8 a 17,1 %, $p \leq 0,01$) (Fig.26I). También se encontró un aumento de la proliferación de TILs CD8+, medida mediante expresión de la proteína Ki67 asociada al ciclo celular (de 12,3 a 22,5 %, $p<0,05$) (Fig.26J). A continuación se examinó la expresión de un conjunto de marcadores de puntos de control inmunitarios en los TILs, incluyendo PD-1, TIM3, Ox40, CTLA4 y LAG3. El tratamiento con aPD-1 dio lugar a una disminución esperada de la expresión de PD-1, pero LB-100 por separado o además de aPD-1 no alteró adicionalmente la expresión de PD-1 en TILs CD4+ y CD8+ (Fig.26K-L). La expresión de TIM3, Ox40, CTLA4 y LAG3 no se modificó significativamente en TILs CD4+ o CD8+ TILs con tratamiento único o combinado (Fig.32), lo que sugiere que existe potencial en la combinación de LB-100 con terapias dirigidas contra estos marcadores de puntos de control.

Dado que el estudio anterior demostró que PP2A desempeña un papel esencial en Treg supresoras, se examinó si la adición de LB-100 podría dar lugar a la depleción de Treg, similar a la terapia anti-CTLA4. Se sabe que aPD-1 actúa al nivel del tumor y con una capacidad limitada para depletar Tregs. Sin embargo, con la adición de LB-100, el tratamiento combinado disminuyó significativamente el porcentaje de células Treg CD4+FoxP3+ entre TILs (de 10,3 a 4,9 % de células T CD3+, $p<0,05$) (Fig.27A-B). La disminución concomitante de Treg y el aumento de células T CD8+ dio lugar a un aumento drástico de la relación de CD8+ respecto a Treg de 3,5 veces entre TILs (de 7,5 a 26,4, $p<0,05$) (Fig.27C). Posteriormente, se evaluó la consecuencia funcional de la combinación LB-100/aPD-1 en TILs. Se analizó la expresión intracelular de IFN- γ en respuesta a la estimulación in vitro con PMA/ionomicina. El tratamiento combinado mejoró significativamente la producción de IFN- γ por TILs CD8+ en relación con el control (de 16,6 a 31,5 % de CD45+, $p<0,05$) (Fig.27D-E). Además, la frecuencia de TILs CD8+ productores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Fig.27F, 33A) y de producción dual de IFN- γ /TNE- α (Fig.27G, 33B) aumentaron significativamente con el tratamiento combinado. La capacidad citolítica de TILs CD8+ también se determinó por la expresión de Granzyme B (GzmB), que también aumentó significativamente con el tratamiento con LB-100/aPD1 (Fig.27H, 33C). En células T CD4+ se observó un aumento pequeño pero estadísticamente significativo en la producción de IFN- γ (de 6,1 a 10,8 % de células CD4+, $p<0,05$) (Fig.27I). Esto sugiere que, si bien no hay un aumento general en la infiltración de CD4+ con la combinación LB-100/aPD1, las células T efectoras CD4+ presentes en el tumor eran, sin embargo, más activas funcionalmente con una producción de IFN- γ potenciada.

En conjunto, la combinación de LB-100 con el bloqueo de aPD-1 dio lugar a un cambio significativo en la composición de TILs (Fig.27J). Si bien la población general de CD45+ se mantuvo relativamente estable, hubo un marcado aumento en la infiltración de células T CD3+, impulsada por una preponderancia de células T CD8+. Al mismo tiempo, la población de Treg se depletó concomitantemente, lo que dio lugar a un aumento drástico en la relación CD8/Treg. Además, las células T CD8+ eran más proliferativas y funcionalmente activas, como lo indican las expresiones de citocinas. Estos hallazgos son consistentes con la observación de que la combinación LB-100/a-PD1 podría provocar un rechazo tumoral duradero en CT26 de manera inmunodependiente.

LB-100 y aPD-1 potencian la actividad antitumoral en el melanoma B16 sin evidencia histológica de autoinmunidad: a continuación se determinó si la combinación LB-100/aPD-1 era efectiva contra otros tumores resistentes a aPD-1. En un modelo de prevención tumoral, los ratones C57BL/6 de 6-8 semanas se aleatorizaron en cuatro grupos de tratamiento: PBS, LB-100, aPD-1 y combinación. Se inocularon células B16F10 ($2,5 \times 10^5$) 2 días después del inicio del tratamiento por vía subcutánea en el flanco torácico derecho. Los tratamientos se administraron cada dos días tras la supervivencia (Fig.34A). Al día 15 después de la implantación del tumor, no hubo diferencia entre las ramas de control y de agente único. Sin embargo, el tamaño tumoral era significativamente menor en el grupo combinado en relación con el control (de 305,9 a 109,0 mm³, $p < 0,05$) (Fig.34B-C) y la supervivencia se prolongó con el tratamiento combinado ($p < 0,05$) (Fig.34D).

Cabe destacar que ninguno de los ratones del grupo combinado mostró signos clínicos de eventos inflamatorios autoinmunitarios. Sin embargo, dado que la combinación LB-100/aPD-1 dio lugar a un aumento de la función efectora y la depleción de Treg, la autoinmunidad es una preocupación. Por lo tanto, se examinó la histología de múltiples órganos de ratones tratados para buscar signos de inflamación. Se sacrificaron ratones C57BL/6 que alcanzaron los criterios de supervivencia y se examinó la histología de la piel, las glándulas salivales, el páncreas, el pulmón y el estómago (Fig.34E, 35). No hubo evidencia en ninguno de los grupos de tratamiento que sugiriera un aumento de infiltración de linfocitos o signos de autoinmunidad.

LB-100 inhibe la actividad de PP2A y potencia la activación de mTORC1: la actividad enzimática de PP2A de células CD4 and CD8 aisladas de esplenocitos de ratones se midió 3 horas después de la estimulación in vitro con CD3 en placa y CD28 soluble. Hubo una disminución dependiente de la dosis en la actividad enzimática de PP2A en células tanto CD4 como CD8, con un efecto mayor en las células CD8 que en las CD4 (Fig.36A).

Después de 3 horas de activación in vitro de células CD3 aisladas, se evaluó la actividad de las vías mTORC1, mTORC2 y PI(3)K-AKT mediante comprobación de la fosforilación de la proteína ribosómica S6 (S6), AKT en Thr473 y AKT en Thr308 respectivamente. Se encontró que, si bien LB-100 tiene un efecto mínimo sobre las vías mTORC2 y PI(3)K-AKT (Fig.36B), hubo un aumento dependiente de la dosis en la actividad de mTORC1 medida por fosforilación de S6 (Fig.36c). Esta diferencia no se observó en ninguna de las 3 vías en un momento temprano de 30 minutos después de la activación (Fig. 37).

LB-100 inhibe el desarrollo de células CD4 sin tratamiento en células reguladoras o Th2 CD4:

Las células CD4 sin tratamiento se aislaron de esplenocitos de ratones y se activaron in vitro con anti-CD3 y CD28 en presencia de TGF- β o IL4 para inducir el desarrollo de células Treg o Th2 CD4+ respectivamente. Después de 72 horas, las expresiones intranucleares de Foxp3 o GATA3 se cuantificaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células Treg o Th2 respectivamente. El tratamiento con LB-100 alteró significativamente la inducción de Foxp3 por TGF- β (Fig.38A) o GATA3 (Fig.38B) por IL-4 de manera dependiente de la dosis. Además, se cuantificó la proporción relativa de células Th2 y Th1 CD4+ por etiquetado para Tbet. La frecuencia de células que expresan GATA3 en relación con células que expresan Tbet disminuyó significativamente con el tratamiento con LB-100 (Fig.38C). A continuación, se exploró la consecuencia funcional de la célula Th1 CD4+ con tratamiento con LB-100. En ambas condiciones de sesgo Th1 y Th2, hubo un aumento dependiente de la dosis en la expresión de IFN- γ y con inhibición de PP2A. Esto se mostró tanto con la tinción intracelular (Fig.38D) como con la medición de la secreción de citocina (Fig.38E-F). Otras citocinas relacionadas con Th1, incluyendo TNF- α y IL2 también aumentaron en ambas condiciones Th1 y Th2. La secreción de IL4 había disminuido tal como se esperaba (Fig.38F). Estos datos sugieren que la inhibición de PP2A disminuyó la formación de Treg y sesgó la diferenciación de células CD4 hacia el linaje Th1, dando lugar a un aumento general en la secreción de citocinas Th1. Estos experimentos in vitro son consistentes con los hallazgos de TILs in vivo y sugieren potencialmente que la inhibición de PP2A potenció la inmunidad contra el cáncer a través de la hiperactivación de mTORC1.

Actividad in vitro de LB-100 en reacciones de linfocitos mixtos humanos: para confirmar adicionalmente que el efecto inmunomodulador de LB-100 tiene utilidad clínica, se realizaron reacciones de linfocitos mixtos (MLR) utilizando PBMC de donantes humanos sanos. Las células dendríticas derivadas de monocitos se cocultivaron con células T alogénicas CD4+ etiquetadas con colorante citosólico CFSE. LB-100 se administró el día del cocultivo (día 0) y de nuevo el día 3. La proliferación y secreción de IFN- γ por células T CD4 se evaluó en el día 5 (Fig.39A). Hubo un aumento significativo en la proliferación de células T CD4, medida por el porcentaje de células en división, con el tratamiento con LB-100 a 1 μ M (31 % en comparación con el 20 % en los controles) (Fig.39B). También hubo una tendencia hacia el aumento de la proliferación a concentraciones más bajas de LB100 (en el intervalo submicromolar). A la dosis elevada de 5 μ M, la proliferación se vio afectada, lo que sugiere que existe una ventana óptima de exposición a LB-

100 que mejora la inmunidad. Se observó un patrón similar con la secreción de IFN- γ (Fig.39C). A 0,2 y 1 μ M de LB-100, la liberación de IFN- γ aumentó de manera significativa de 3,5 a 4 veces respectivamente. También se examinó el efecto de la diferenciación del linaje en las células T CD4 mediante etiquetado para T-bet. LB-100 a 1 μ M aumentó significativamente la expresión de T-bet (Fig.8D), confirmando nuestro hallazgo anterior de que LB-100 parece sesgar el linaje de CD4 hacia la diferenciación de Th1. A continuación, se comprobó si LB-100 podría potenciar la secreción de IFN- γ *in vitro* en combinación con el bloqueo de PD1 utilizando nivolumab. Se realizó un ensayo similar de MLR con LB-100. Se encontró que LB-100 tenía un efecto sinérgico con el bloqueo anti-PD1 (aPD-1) y potenciaba la secreción de IFN- γ en comparación con los agentes únicos (Fig.39E).

10 Materiales y métodos

Fármacos - nivolumab se obtuvo de Bristol-Myers Squibb y LB-100 se obtuvo de Lixte Biotechnology Holdings, Inc.

Líneas celulares - CT26. Las líneas celulares de carcinoma de colon CL25, melanoma B16 F10 y carcinoma mamario 4T1 se obtuvieron de ATCC. Se cultivaron células tumorales en medio completo (RPMI 1640, Gibco) que contenía 10 % (vol/vol) de FBS (Gibco), 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomycin (Gibco).

Se mantuvieron modelos tumorales singénicos en ratones y se llevaron a cabo experimentos con la aprobación de los Comités de Uso y Cuidado de Animales de NINDS. Para tumores CT26: Se adquirieron BALB/c (6-8 semanas de edad) en Charles River Laboratory. Se inyectaron células CT26 ($0,5 \times 10^6$) en el flanco derecho por vía subcutánea. Una vez que los tumores alcanzaron un volumen de 30-100 mm³ (día 0), los ratones se aleatorizaron y se trataron con PBS, LB-100 (0,156 mg/kg) y/o anti-ratón PD-1 (10 mg/kg) (RMP1-14; IgG2b en rata; Bio X Cell). Los tratamientos se administraron cada 2 días durante 30 días. El volumen tumoral se midió cada 2 días utilizando un calibrador y el volumen tumoral se calculó según la fórmula: Volumen (mm³) = $L \times W^2 / 2$, donde L es la longitud y W es la anchura del tumor (en milímetros). Para tumores B16: Se adquirieron C57BL/6 (6-8 semanas de edad) en Charles River Laboratory. Los ratones se aleatorizaron en los respectivos grupos de tratamiento y se inyectaron células B16F10 ($0,5 \times 10^6$) en el flanco derecho por vía subcutánea 2 días después del tratamiento inicial. El tratamiento y las mediciones se realizaron cada 2 días. El criterio de valoración de supervivencia se definió al alcanzar cualquiera de los siguientes criterios: 1) volumen tumoral superior a 2000 mm³, 2) diámetro tumoral superior a 2 cm, 3) necrosis cutánea grave que no cicatrizaba sobre el tumor. Cuando se indicó, algunos ratones se depletaron para células T CD8+ por inyección de 250 μ g de anticuerpos depletantes de CD8 (clon 53.6.7; BioXcell). Las inyecciones se administraron 2 días y 1 día antes del tratamiento, el día del inicio del tratamiento, a los días 5 y 8 después del inicio de la terapia, y en adelante semanalmente.

Estudios de reexposición tumoral - Se inocularon ratones BALB/c sin tratamiento y previamente curados (CR) con terapia combinada de tumores CT26 con $0,5 \times 10^6$ células CT26 en el flanco torácico izquierdo (CR) y derecho (sin tratamiento). Cuando se indicó, algunos ratones también se inocularon con $1,25 \times 10^5$ células de carcinoma mamario 4T1 en la almohadilla de grasa mamaria. A continuación, se monitorizó el volumen de los tumores de forma similar a la anterior.

Aislamiento de TILs - Los ratones fueron inyectados en el flanco torácico derecho con $0,5 \times 10^6$ células CT26 y tratados como se indicó anteriormente después de que los tumores alcanzaran entre 50-100 mm³. Después de 2 tratamientos, se sacrificaron los ratones y se extirparon los tumores. Los tumores se sometieron a disrupción mecánica utilizando un disociador GentleMACS (Miltenyi Biotec) en presencia de digestión enzimática con el kit de disociación tumoral (Miltenyi Biotec). La estrategia de clasificación utilizada para el análisis de TILs se muestra en la Fig. S3. Tinción de citocina intracelular, fosfoflujo y citometría de flujo - Las suspensiones que contenían células T se tiñeron con una tinción de vivos/muertos (Invitrogen) en PBS seguida de una tinción de anticuerpos de superficie en tampón FACS (PBS con 0,5 % de BSA y 0,1 % de azida sódica). Para la tinción intracelular, las células se tiñeron para las moléculas de superficie seguido fijación y permeabilización (eBioscience). Para la tinción de citocinas, las células se estimularon en primer lugar con un cóctel de estimulación celular (eBioscience) que contenía PMA/Ionomycin e inhibidor de transporte de proteínas antes de someterse a la tinción. Para la fosfotinción, se utilizó 4 % de formaldehído para la fijación y se utilizó 100 % de metanol para protocolos de permeabilización. Las células se analizaron por citometría de flujo (LSRII; BD Bioscience). El análisis de datos se realizó con el software FlowJo (TreeStar).

Ensayo de fosfatasa PP2A - Se aislaron células T CD4+ y CD8+ con el kit de aislamiento CD4 y CD8 (StemCell) respectivamente. Se activaron las células utilizando anti-CD3 inmovilizado (10 ug/ml) y anti-CD28 soluble (2 ug/ml) durante tres horas. A continuación, se evaluó la actividad de PP2A después de la inmunoprecipitación utilizando un kit de ensayo de fosfatasa verde de malaquita según las indicaciones del fabricante (EMD Millipore).

Estimulación y sesgo de células T - Se aislaron células CD4 sin tratamiento de esplenocitos de ratones (StemCell). Se activaron las células durante 3 días utilizando anti-CD3 inmovilizado (10 ug/ml) y anti-CD28 soluble (2 ug/ml). Las condiciones de sesgo eran las siguientes: T_H1, 1 .ig/mL anti-IL4, 5 ng/mL IL2, y 10 ng/mL IL12; T_H2, 1 .ig/mL anti-IFN- γ , 5 ng/mL IL2, y 10 ng/mL IL4 ; Treg, 1 .ig/ mL anti-IFN γ , y 1 ig/mL anti-IL4, y 2 ng/ mL TGF β 1. Se utilizaron inmunoensayos de flujo multianálisis basados en perlas (BD Bioscience) para medir la producción de citocinas en el sobrenadante según las instrucciones del fabricante. El número absoluto de células se cuantificó con citometría de flujo utilizando perlas de recuento (Biolegend).

Anticuerpos para citometría de flujo - Anti-ratón: α -CD45 (30-F11, BD), α -CD3 (145-2C11, Biolegend), α -CD4 (GK1.5, Biolegend), α -CD8 (53-6.7, BD), α -PD-1 (J43, ThermoFisher), α -CTLA4 (1B8, abcam), α -TIM-3 (B8.2C12, Biolegend), α -OX-40 (OX-86, Biolegend), α -CD62L (MEL-14, BD), α -CD44 (IM7, Biolegend), α -LAG-3 (C9B7W, Biolegend), α -IFN- γ (XMG1.2, Biolegend), α -TNF- α (MP6-XT22, Biolegend), α -Granzyme B (NGZB, ThermoFisher), α -FOXP3 (MF-14, Biolegend), α -Ki67 (SolA15, ThermoFisher). Antihumano: α -CD4 (A161A1, Biolegend), α -T-bet (4B10, Biolegend), α -Phospho-Akt (Ser473) (D9E, Cell Signaling), α -Phospho-Akt (Thr308) (D25E6, señalización celular), proteína ribosómica α -fosfo-S6 (Ser235/236) (D57.2.2E, señalización celular).

Histología - Los tejidos fijados en formol fueron procesados, teñidos en hematoxilina y eosina y evaluados a ciegas por un patólogo certificado.

Reacción de linfocitos mixtos humanos - como se describió anteriormente en ³⁹. Las células dendríticas (DC) se generaron mediante el cultivo de monocitos aislados de PBMC utilizando un kit de aislamiento de monocitos (StemCell) in vitro durante 7 días con 500U/ml de interleucina-4 (IL-4) y 250 U/ml de GM-CSF (R&D Systems). Las células T CD4⁺ (1×10^5) aisladas con kit de aislamiento de CD4 (StemCell) y etiquetadas con CFSE (ThermoFisher) se cocultivaron con DC alogénicas (1×10^4). Al inicio del ensayo, se añadió una titración de LB-100 y/o nivolumab. Después de 3 días, se repuso LB-100 a la concentración final indicada. Después de 5 días, se analizaron los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA (eBioscience) y se analizaron las células mediante citometría de flujo. Se obtuvieron al menos 3 donantes distintos y se presentaron los resultados de un donante representativo.

Estadísticas - si no se indica lo contrario en la leyenda de la figura, las muestras se analizaron con el software GraphPad Prism utilizando la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los diagramas de puntos de dispersión se representan como medias con SEM.

REFERENCIAS

Apostolidis S, Rodriguez-Rodriguez N, Suárez-Fueyo A et al. Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2016; 17:556-64.

Bai X, Zhi X, Zhang Q et al. Inhibition of protein phosphatase 2A sensitizes pancreatic cancer to chemotherapy by increasing drug perfusion via HIF-1 α -VEGF mediated angiogenesis. *Cancer Lett*. 2014; 355:281-287.

Bai XL, Zhang Q, Ye LY, et al. Inhibition of protein phosphatase 2A enhances cytotoxicity and accessibility of chemotherapeutic drugs to hepatocellular carcinomas. *Mol Cancer Ther*. 2014; 13:2062-72.

Baroja, M.L. et al. Inhibition of CTLA-4 Function by the Regulatory Subunit of Serine/Threonine Phosphatase 2A. *J Immunol* 2002; 168:5070-5078.

Bertini I, Calderone V, Fragai M, Luchinat C, Tallu E. Structural Basis of Serine/Threonine Phosphatase Inhibition by the Archetypal Small Molecules Cantharidin and Norcantharidin. *J. Med. Chem*. 2009; 52:4838-4843.

Bian Y, Kitagawa R, KB Parmil, Fujii Y, Stepanov A, and Kitagawa K. Synthetic genetic array screen identifies PP2A as a therapeutic target in Mad2-overexpressing tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111:1628-1633

Brahmer JR, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28, 31673175 (2010).

Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P: A new member of the immunoglobulin superfamily - CTLA-4. *Nature* 1987; 328:267-270.

Carreno BM, Bennett F, Chau TA, Ling V, Luxenberg D, Jussif J, Baroja ML, Madrenas J: CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol* 2000; 165:1352-1356.

Chang KE, Wei BR, Madigan JP et al. The Protein Phosphatase 2A Inhibitor LB-100 Sensitizes Ovarian Carcinoma Cells to Cisplatin-Mediated Cytotoxicity. *Mol Cancer Ther*. 2015; 14:90-100.

Chapman NM, Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy* 6, 1295-1311 (2014).

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39, 1-10 (2013).

Chuang, E. et al. The CD28 and CTLA-4 Receptors Associate with the Serine/Threonine Phosphatase PP2A. 2000, *Immunity*, Vol. 13, 313-322.

Chung V, Mansfield AS, Braiteh F, Richards D, Durivage H, Ungerleider RS, Johnson F, and Kovach JS. Safety, tolerability, and preliminary activity of LB-100, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in patients with relapsed solid tumors. Clin Cancer Res 2017.

Chung, V. Phase I study of LB-100 with docetaxel in solid tumors. 2013: ClinicalTrials.gov.

Delgoffe GM, et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. Nat Immunol 12, 295-303 (2011).

Delgoffe GM. PP2A's restraint of mTOR is critical for T(reg) cell activity. Nat Immunol 17, 478-479 (2016).

Ebert PJ, et al. MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. Immunity 44, 609-621 (2016).

Efferth, T. et al. (2005) Molecular modes of action of cantharidin in tumor cells. Biochem Pharmacol. 69(5): p. 811-8.

Efferth, T. et al. (2002) Activity of drugs from traditional Chinese medicine toward sensitive and MDR1- or MRP1-overexpressing multidrug-resistant human CCRF-CEM leukemia cells. Blood Cells Mol Dis. 28(2): p. 160-8.

Eil R, Vodnala SK, Clever D., Klebanoff CA, Sukumar M, Pan JH, Palmar DC, Gros A, Yamamoto TN, Patel SJ, Guittard GC, Yu Z, Carbonaro V, Okkenhaug K, Schrumpp DS, Linehan WM, Roychoudhuri R, Restifo NP. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. Nature 2016, 537:539-543.

Falconer IR, Humpage AR. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga cylindrospermopsis raciborskii containing the toxin cylindrospermopsin. Environ Toxicol 16, 192-195 (2001).

Gehringer MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. FEBS Lett 557, 1-8 (2004).

Gordon IK, Lu J, Graves CA et al. Protein Phosphatase 2A Inhibition with LB-100 Enhances Radiation-Induced Mitotic Catastrophe and Tumor Growth Delay in Glioblastoma. Mol Cancer Ther. 2015, 14:1540-47.

Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells. J Exp Med 205, 565-574 (2008).

Hein AL, Seshacharyulu P, Rachagani S et al. PR55 α Subunit of Protein Phosphatase 2A Supports the Tumorigenic and Metastatic Potential of Pancreatic Cancer Cells by Sustaining Hyperactive Oncogenic Signaling. Cancer Res. 2016, 8:2243-53

Ho WS, Feldman MJ, Maric D et al. PP2A inhibition with LB-100 enhances cisplatin cytotoxicity and overcomes cisplatin resistance in medulloblastoma cells. Oncotarget. 2016, 7:12447-63.

Hodi, F. S. et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. 2010, N Engl J Med, 363;8.

Holmgaard RB, Zamarin D, Munn DH, Wolchok JD, Allison JP. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. J Exp Med 210, 1389-1402 (2013).

Hong CS, Ho W, Zhang C, Yang C, Elder JB, Zhuang Z. LB-100, a Small Molecule Inhibitor of PP2A with Potent Chemo- and Radio-sensitizing Potential. Cancer Biol Ther. 2015, 16:821-33.

Janssens V, Longin S, Goris J. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). Trends Biochem Sci 33, 113-121 (2008).

Janssens V, Rebollo A. The Role and Therapeutic Potential of Ser/Thr Phosphatase PP2A in Apoptotic Signalling Networks in Human Cancer Cells. Curr Mol Med. 2012, 12:268-287.

Joseph F. Grosso and Maria N. Jure-Kunkel. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Cancer Immun. 2013; 13: 5.

Kiely M, Kiely PA. PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing? *Cancers (Basel)* 7, 648-669 (2015).

Kingwell K. Cancer: Live screening of immunotherapy targets. *Nat Rev Drug Discov* 13, 258 (2014).

5 Kovach JS, Johnson F. (2008) Oxabicycloheptanes and oxabicycloheptenes, their preparation and use. US 7998957, Aug 16, 2011.

Larkin J, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 373, 23-34 (2015).

10 Lê L, Erlichman C, Pillon L et al. Phase I and pharmacokinetic study of fostriecin given as an intravenous bolus daily for five consecutive days. *Invest New Drugs* 2004, 22:159-167.

15 Lecca S, et al. Rescue of GABAB and GIRK function in the lateral habenula by protein phosphatase 2A inhibition ameliorates depression-like phenotypes in mice. *Nat Med* 22, 254-261 (2016).

Lu, J. et al. Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. 106(28): p. 11697-702.

20 Lv Peng, Wang Y, Ma J et al. Inhibition of protein phosphatase 2A with a small molecule LB-100 radiosensitizes nasopharyngeal carcinoma xenografts by inducing mitotic catastrophe and blocking DNA damage repair. *Oncotarget*. 2014, 5:7512-7524.

25 Martiniova, L. et al. Pharmacologic modulation of serine/threonine phosphorylation highly sensitizes PHEO in a MPC cell and mouse model to conventional chemotherapy. *PLoS One*, 2011. 6(2): p. e14678.

Melero I, Rouzaut A, Motz GT, Coukos G. T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. *Cancer Discov* 4, 522-526 (2014).

30 Mumby M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* 2007;130:21-4.

Ngiow SF, et al. A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Res* 75, 3800-3811 (2015).

35 Parry, R.V. et al. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, p. 9543-9553 Vol. 25, No. 21.

Perotti D, Neviani P. Targeting A Tumor Suppressor To Suppress Tumor Growth: News and Views on Protein Phosphatase 2A (PP2A) as a Target for Anti-cancer Therapy. *Lancet Oncol*. 2013, 14:e229-e238.

40 Pico de Coana, Y. et al. Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system *Trends in Molecular Medicine* (2015) 1-10.

45 Quang C, Simko JL, Nethero WC, Groeber EA, Kovach JS. LC-MS/MS Method Development and Validation for the Quantification of LB-100 and Endothall Metabolite in Biological Matrices (20). Poster MP 158, American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 6 2016, San Antonio, TX

50 Robert C, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *NEngl J Med* 372, 320-330 (2015).

Rossini GP, Sgarbi N, Malaguti C. The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. *Toxicon* 39, 763-770 (2001).

55 Sagiv-Barfi I, Kohrt HE, Czerwinski DK, Ng PP, Chang BY, Levy R. Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E966-972 (2015).

60 Sangodkar J, Farrington CC, McClinch K, Galsky MD, Kastrinsky DB, Narla G. All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *FEBS J* 2016, 283 :1004-24.

Sallman D, Wei S, List A et al. PP2A: the Achilles heal in MDS with 5q deletion. *Front Oncol*. 2014, 4:1-7.

65 Schwartzman JM, Pascal HGD, Sotillo R, Coker C, Benezra R. Mad2 Is a Critical Mediator of the Chromosome Instability Observed upon Rb and p53 Pathway Inhibition. *Cancer Cell* 2011, 19:701-714.

Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K et al. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett.* 2013, 335:9-118.

Shi Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* 2009, 139: 468-484.

Snyder, A. et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. 2014, *N Engl J Med*, 371;23.

Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG. Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Res* 36, 5593-5606 (2016).

Swart M, Verbrugge I, Beltman. Combination Approaches with Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* 2016, 6:233.

Taffs RE, Redegeld FA, and Sitkovsky. Modulation of cytolytic T lymphocyte functions by an inhibitor of serine/threonine phosphatase, okadaic acid. Enhancement of cytolytic T lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 1991, 147:722-728.

Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J: A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 2006, 24:65-97.

Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J: Structure-Function analysis of the CTLA-4 interaction with PP2A. *BMC Immunology* 2009, 10:23.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune Checkpoint Blockage: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* 2015, 27:450-461.

Tsiatas M, Mountzios, Curigliano. Future perspective in cancer immunotherapy. *Ann Transl Med* 2016, 4(14):273.

Wang C, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res* 2, 846-856 (2014).

Wang GS. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J Ethnopharmacol.* 1989, 2:147-62.

Wei, D. et al. Inhibition of protein phosphatase 2A radiosensitizes pancreatic cancers by modulating CDC25C/CDK1 and homologous recombination repair. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(16): p. 4422-32.

Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med.* 2008, 14:152-160.

Yatsunami J, Komori A, Ohta T, Suganuma M, Yuspa SH, Fujiki H. Hyperphosphorylation of cytokeratins by okadaic acid class tumor promoters in primary human keratinocytes. *Cancer Res* 53, 992-996 (1993).

Zhang, C. et al. A synthetic cantharidin analog for the enhancement of doxorubicin suppression of stem cell-derived aggressive sarcoma. *Biomaterials*, 2010. 31(36): p. 9535-43.

Zhang M, Yogesha SD, Mayfield JE, Gill GN, Zhang Y. Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers. *FEBS J* 280, 4739-4760 (2013).

Zhou P, Shaffer DR, Alvarez DA et al. In vivo Discovery of Immunotherapy Targets in the Tumor Microenvironment. *Nature* 2014, 506:52-57.

Zhuang Z, Lu J, Lonser R, Kovach JS. Enhancement of cancer chemotherapy by simultaneously altering cell cycle progression and DNA-damage defenses through global modification of the serine/threonine phosphoproteome. *Cell Cycle.* 2009, 8:3303-6.

US 8,697,845 B2, issued April 15, 2014.

REIVINDICACIONES

1. Inhibidor de PP2A para uso en un método de:

(I) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del inhibidor PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control, en donde las cantidades, cuando se toman conjuntamente, son efectivas para tratar al sujeto; o:

(II) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer y recepción de un inhibidor de puntos de control que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor PP2A eficaz para potenciar el tratamiento en relación con el inhibidor de puntos de control por separado; o:

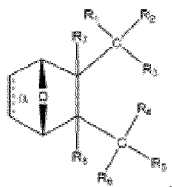
(III) tratamiento de un sujeto afectado por cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva del inhibidor PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control, en donde las cantidades, cuando se toman conjuntamente, son efectivas para tratar el tumor o el cáncer; o:

(IV) aumento de una respuesta de las células T a las células cancerosas en un sujeto afectado por el cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control eficaz para aumentar la respuesta de las células T a las células cancerosas; o:

(V) aumento de la activación de las células T en un sujeto afectado por el cáncer que comprende la administración al sujeto de una cantidad de inhibidor de PP2A en combinación con una cantidad efectiva de un inhibidor de puntos de control para aumentar de este modo la activación de las células T;

en donde el inhibidor de puntos de control es atezolizumab, nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab o tremelimumab;

y
en donde el inhibidor de PP2A es un compuesto que tiene la estructura:



en donde

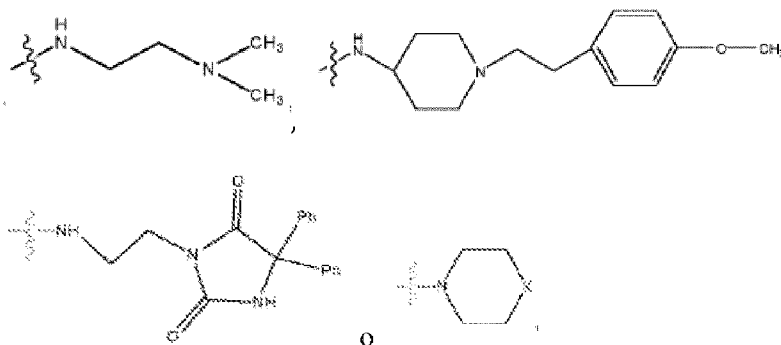
el enlace α está presente o ausente;

R1 y R2 son conjuntamente =O;

R3 es OH, O- u OR9,

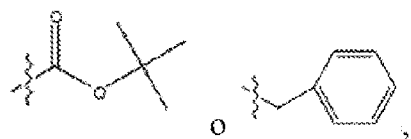
en donde R9 es alquilo, alqueno, alquino o arilo;

R4 es



donde X es O, S, NR10, N+HR10 o N+R10R10,

donde cada R10 es independientemente H, alquilo, alqueno, alquino, arilo,



R5 y R6 tomados conjuntamente son =O;

R7 y R8 son cada uno H;

o una sal, zwitterión o éster del mismo.

2. El inhibidor de PP2A para uso según la reivindicación 1, en donde

(I) la cantidad de compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo y la cantidad de inhibidor de puntos de control se administran periódicamente al sujeto; y/o:

(II) la cantidad de compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo y la cantidad de inhibidor de puntos de control se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente; y/o:

5 (III) el inhibidor de puntos de control se administra paralelamente a, antes o después del compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo; y/o:

(IV) la cantidad de inhibidor de puntos de control y la cantidad de compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo cuando se administran conjuntamente es más efectiva para tratar al sujeto que cuando cada agente se administra por separado en la misma cantidad; y/o:

10 (V) la cantidad de compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo y la cantidad de inhibidor de puntos de control cuando se toman conjuntamente es efectiva para reducir un síntoma clínico del cáncer en el sujeto; y/o:

(VI) el compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo potencia el efecto inmunoterapéutico del inhibidor de puntos de control; y/o:

(VII) el cáncer es susceptible de tratamiento mediante una respuesta inmunitaria.

15 3. El inhibidor de PP2A para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde

(I) el cáncer es melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, carcinoma urotelial o cáncer de ovario; o:

20 (II) el compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo se administra a una dosis de 0,25 mg/ m², 0,5 mg/ m², 0,83 mg/ m², 1,25 mg/ m², 1,75 mg/ m², 2,33 mg/ m² o 3,1 mg/ m²; o:

(III) el compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo se administra durante 3 días cada 3 semanas.

4. El inhibidor de PP2A para uso según la reivindicación 3, en donde el cáncer es melanoma o en donde el compuesto o sal, zwitterión o éster del mismo se administra a una dosis de 2,33 mg/m².

25 5. El inhibidor de PP2A para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde

(I) el ipilimumab se administra por vía intravenosa a una dosis de 0,5 mg/kg -10 mg/kg o menos, o

(II) el atezolizumab se administra por vía intravenosa a una dosis de 0,1 mg/kg - 20 mg/kg o menos, o

(III) el nivolumab se administra por vía intravenosa a una dosis de 0,1 mg/kg -10 mg/kg o menos; o

30 (IV) el pembrolizumab se administra por vía intravenosa a una dosis de 1 mg/kg -10 mg/kg o menos.

6. El inhibidor de PP2A para uso según la reivindicación 5, en donde:

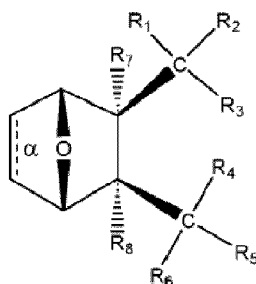
el ipilimumab se administra por vía intravenosa durante 90 minutos cada 3 semanas o menos;

el atezolizumab se administra por vía intravenosa durante 60 minutos cada 3 semanas o menos;

35 el nivolumab se administra por vía intravenosa durante 60 minutos cada 2 semanas o menos; o: el pembrolizumab se administra por vía intravenosa durante 30 minutos cada 3 semanas o menos.

7. El inhibidor de PP2A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto tiene la estructura:

40



o una sal, zwitterión o éster del mismo.

45 8. El inhibidor de PP2A para uso según la reivindicación 1 o 7, en donde

(I) el enlace α está presente; o:

(II) el enlace α está ausente.

9. El inhibidor de PP2A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde

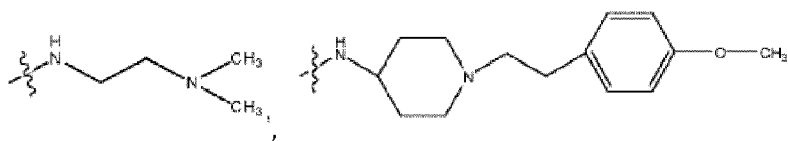
50 (I) R₉ es metilo, etilo o fenilo; o

(II) R₉ es metilo.

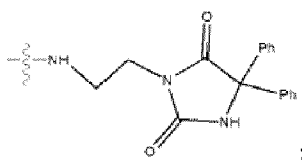
10. El inhibidor de PP2A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde:

(I) R₄ es

55

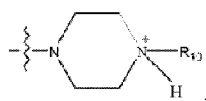


o



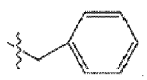
5

o
(II) R₄ es



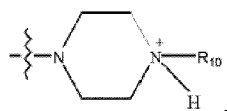
10

en donde R₁₀ es H, alquilo, alqueno, alquino, arilo o



15

11. El inhibidor de PP2A para uso según la reivindicación 10, en donde R₄ es



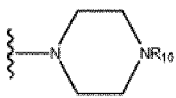
20

y en donde R₁₀ es H, -CH₃, -CH₂CH₃ o

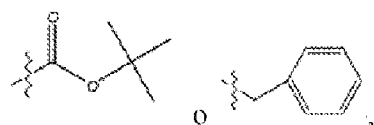


25

12. El inhibidor de PP2A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde R₄ es

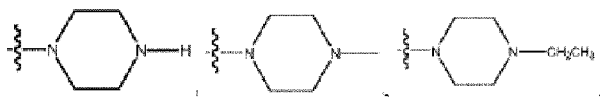


en donde R₁₀ es H, alquilo, alqueno, alquino, arilo,

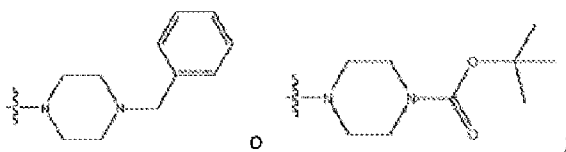


30

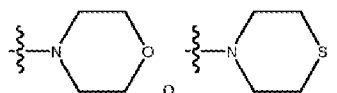
13. El inhibidor de PP2A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde
(I) R₄ es



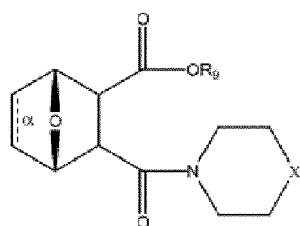
35



o
(II) R4 es



14. El inhibidor de PP2A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el compuesto tiene la estructura



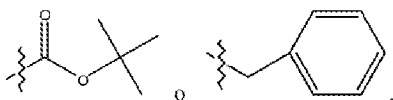
en donde:

el enlace α está presente o ausente;

R₉ está presente o ausente y, cuando está presente, es alquilo, alquenilo, alquinilo o fenilo; y

X es O, S, NR₁₀, N⁺HR₁₀ o N⁺R₁₀R₁₀,

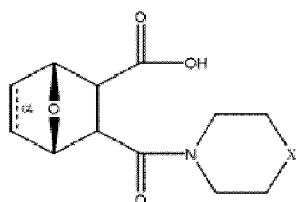
donde cada R₁₀ es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo,



o una sal, zwitterión o éster del mismo.

15. El inhibidor de PP2A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde

(I) el compuesto tiene la estructura

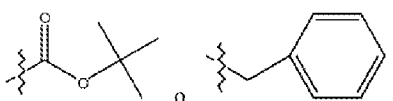


en donde:

el enlace α está presente o ausente

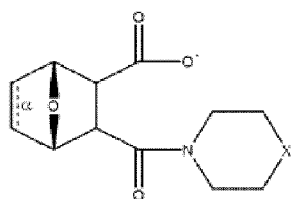
X es O o NR₁₀,

donde cada R₁₀ es independientemente H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo,



o una sal, zwitterión o éster del mismo; o

(II) el compuesto tiene la estructura

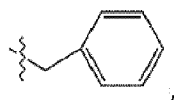


en donde:

5 el enlace α está presente o ausente

X es O o NH^+R_{10} ,

donde R_{10} es H, alquilo, alquilo sustituido, alquenilo, alquenilo sustituido, alquinilo, alquinilo sustituido, arilo o

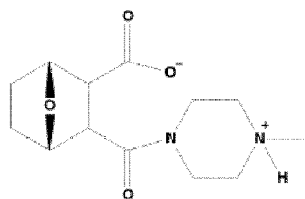


10

o una sal, zwitterión o éster del mismo.

16. El inhibidor de PP2A para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el compuesto tiene la estructura

15



o una sal o éster del mismo.

20

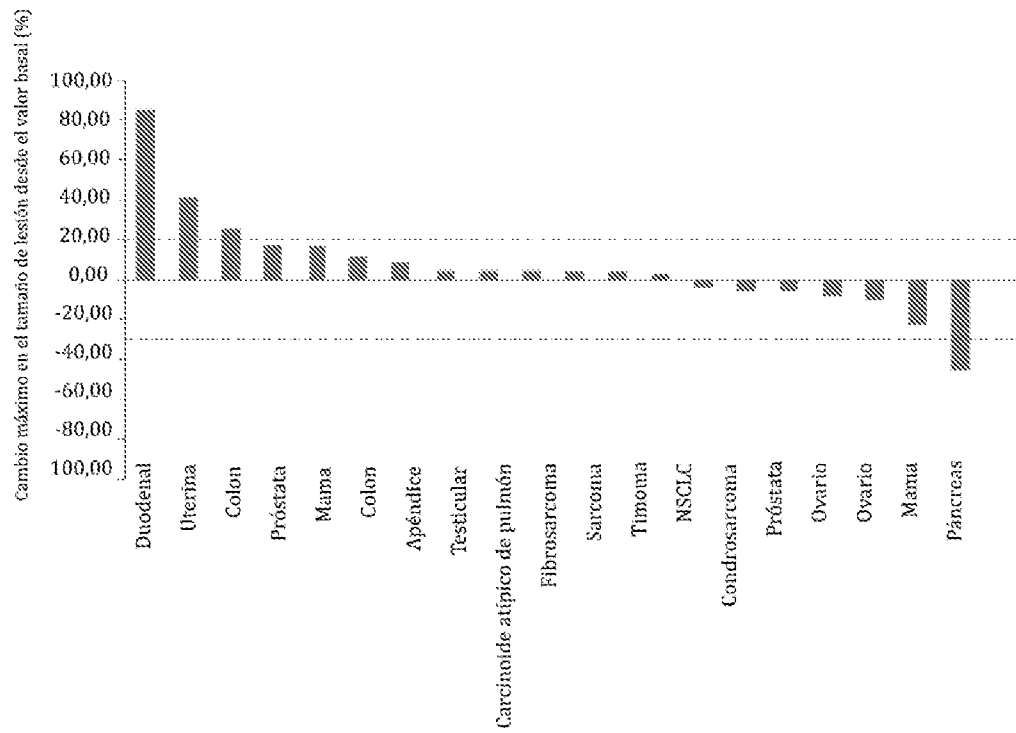


FIG. 1

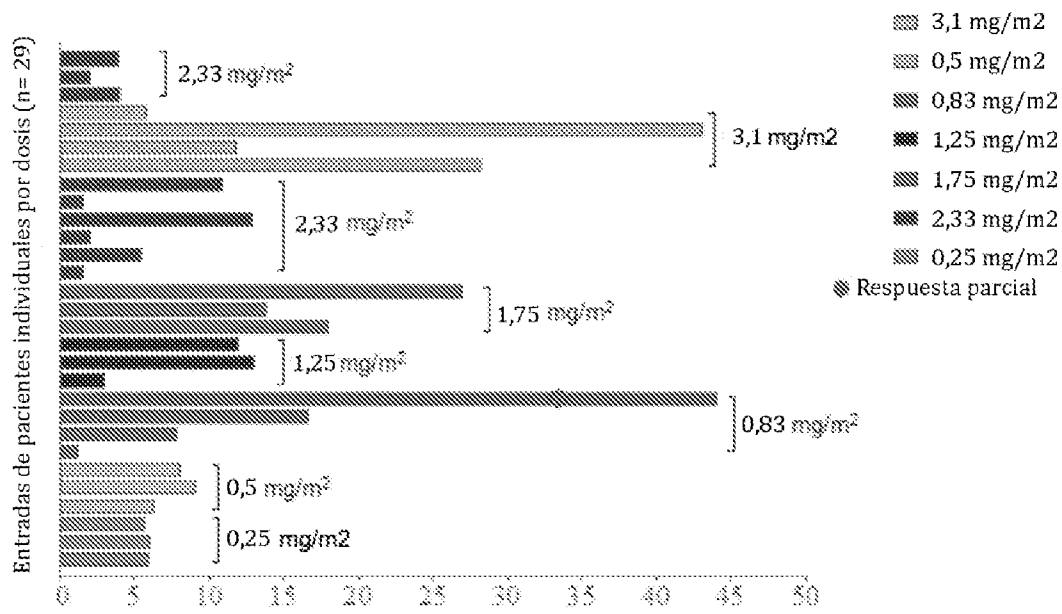
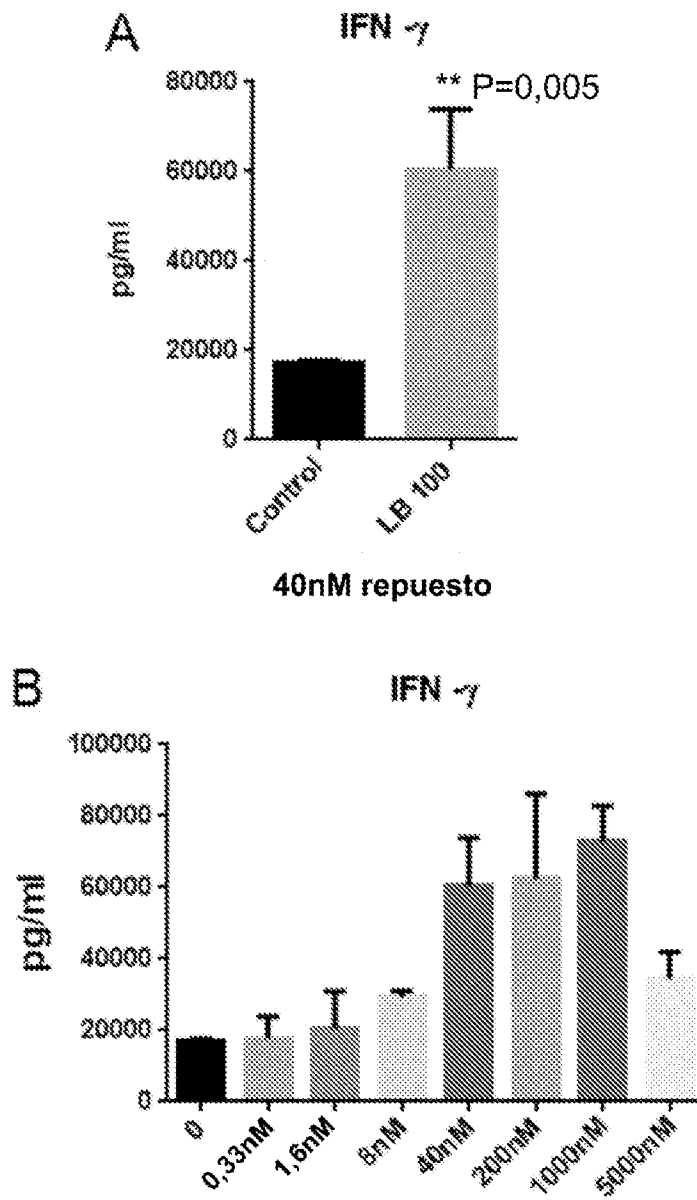
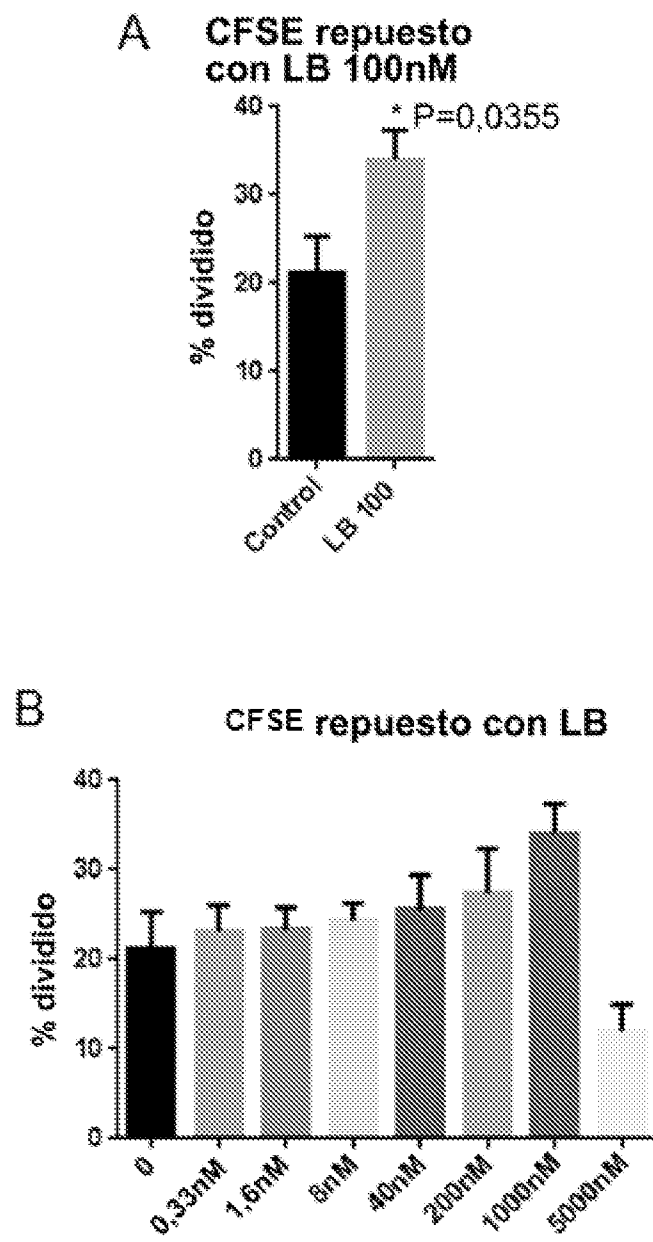


Figura 2: Duración del estudio (semanas)

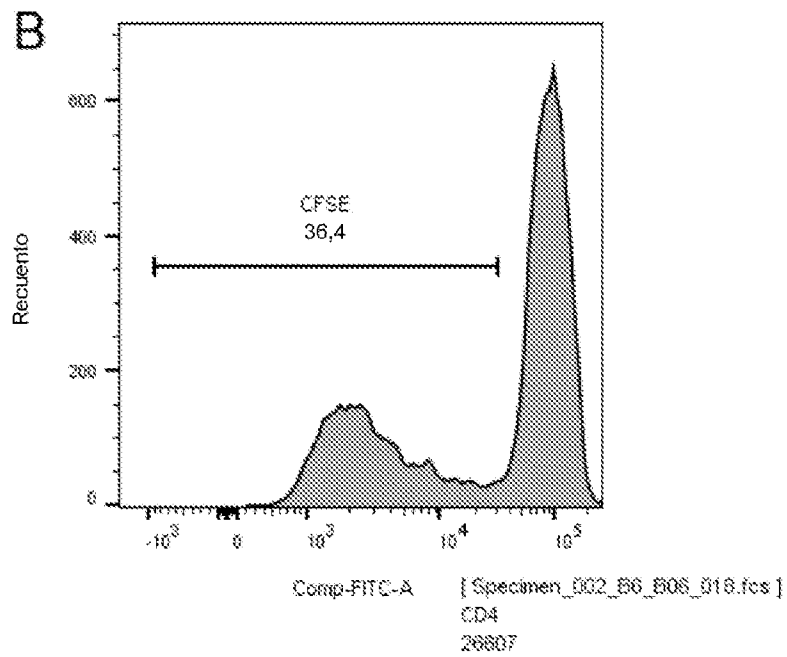
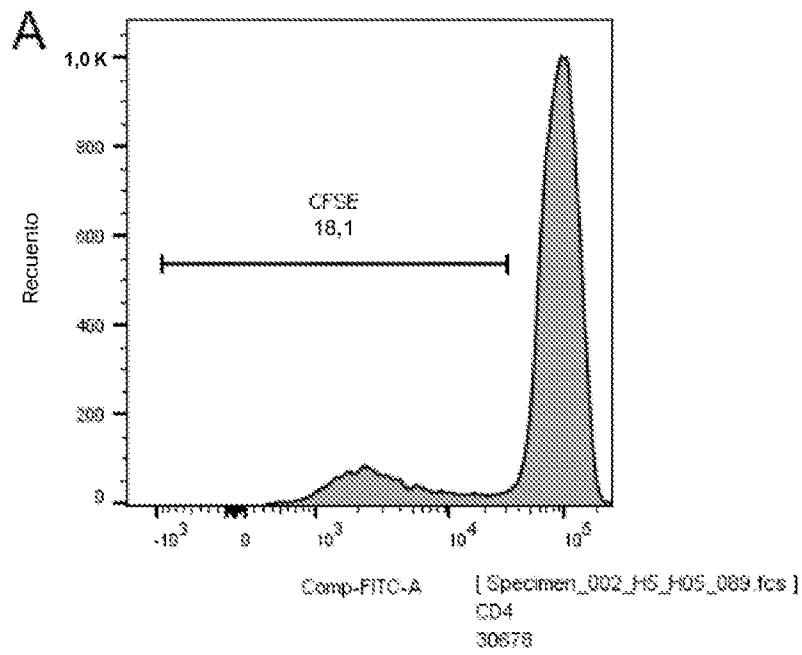
FIG. 2



FIGS. 3A-3B

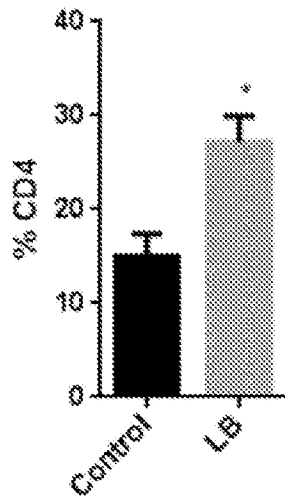


FIGS. 4A-4B

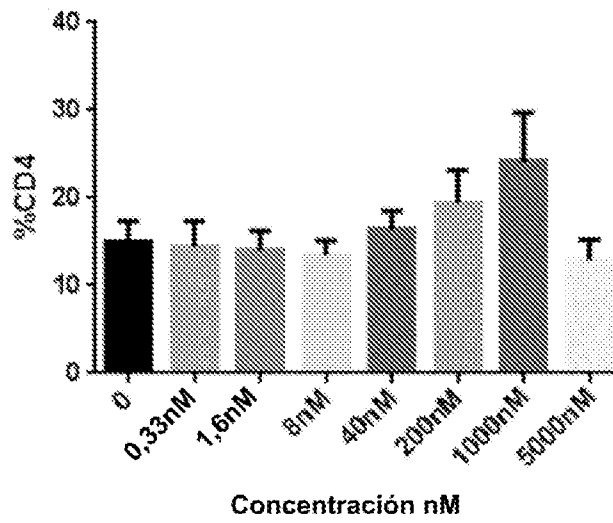


FIGS. 5A-5B

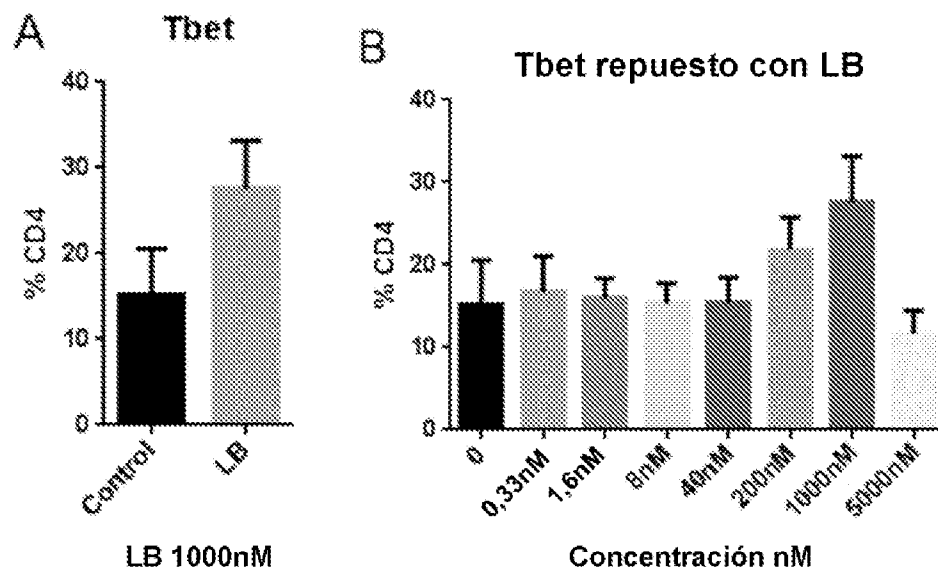
A OX40 repuesto con LB 1000nM



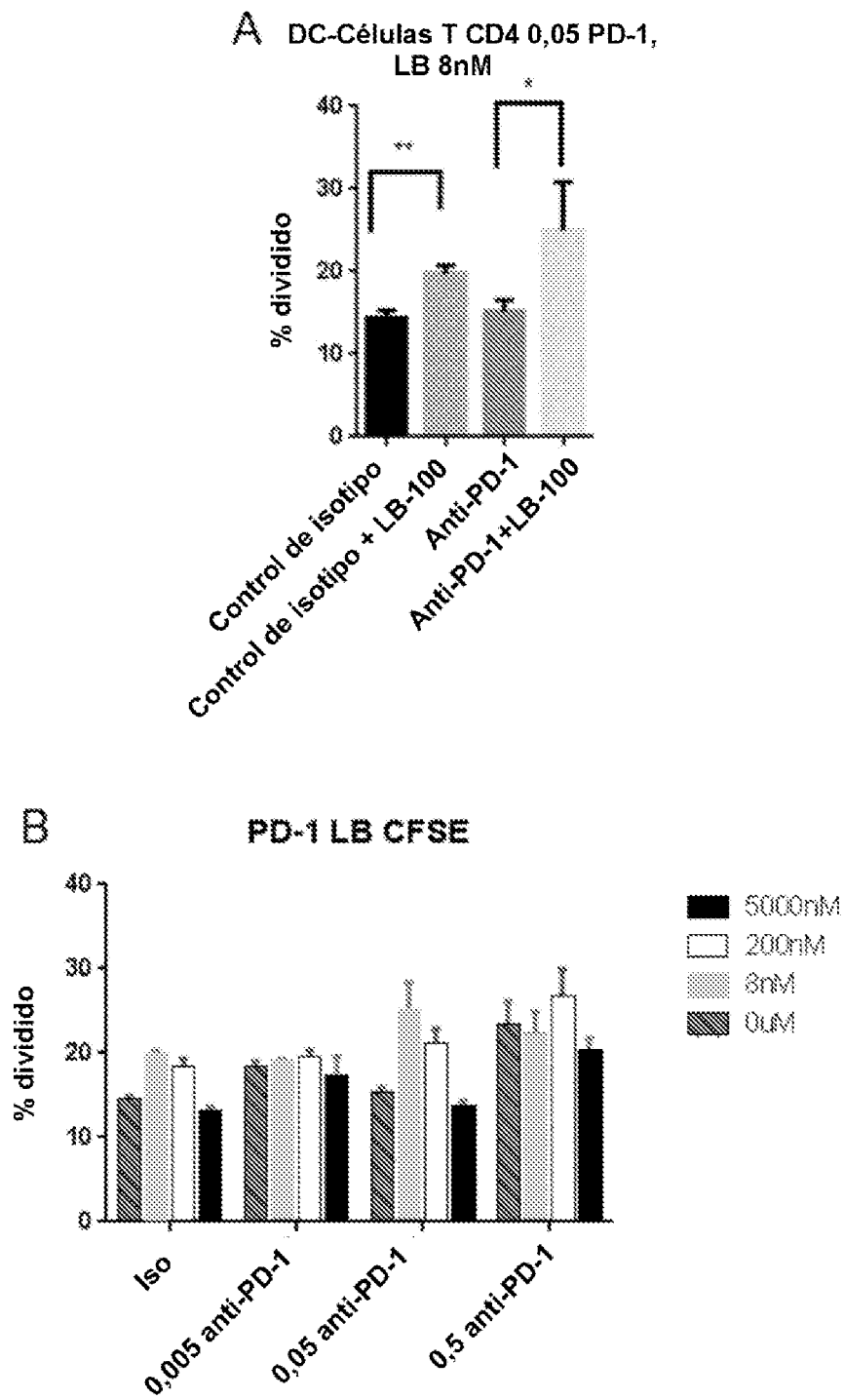
B OX40 repuesto con LB



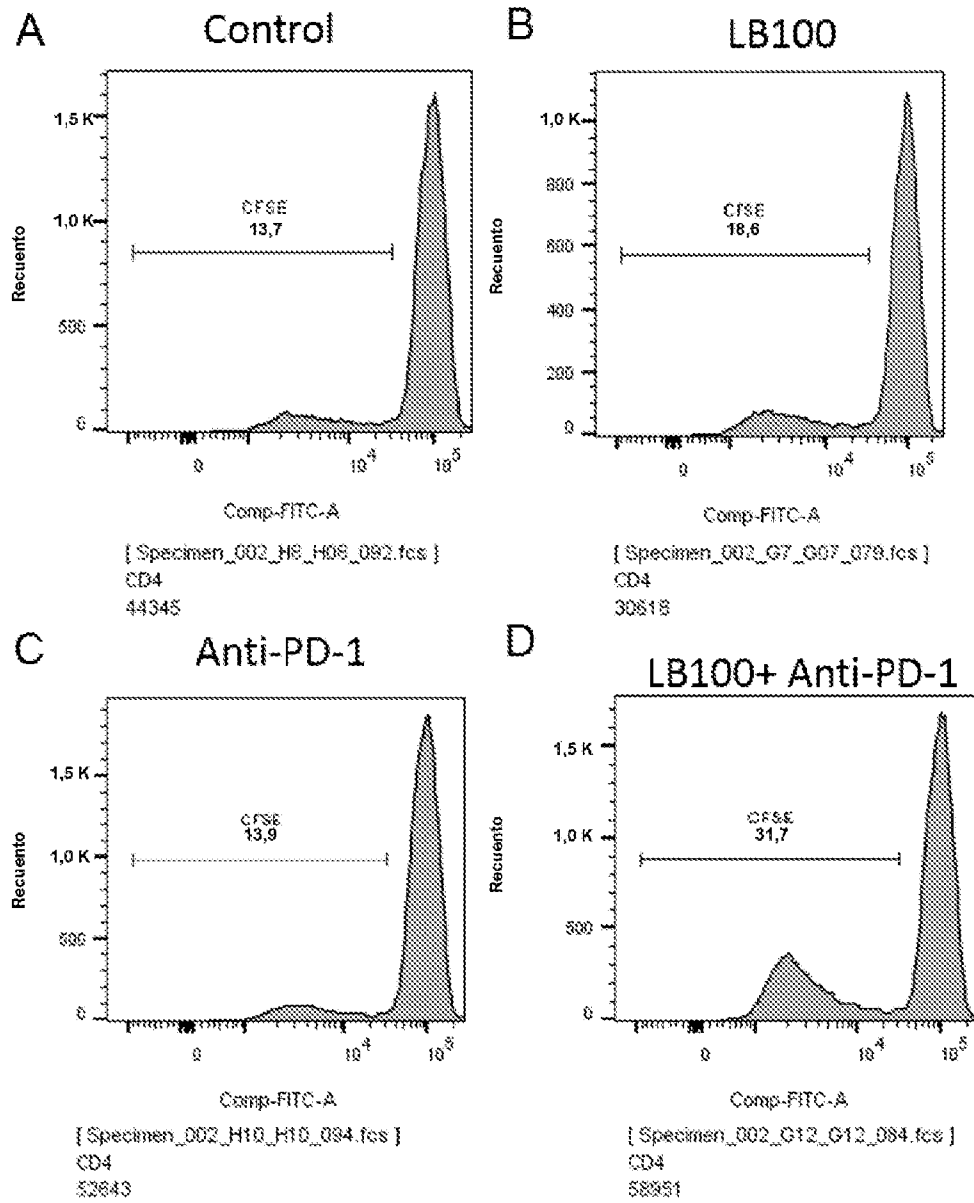
FIGS. 6A-6B



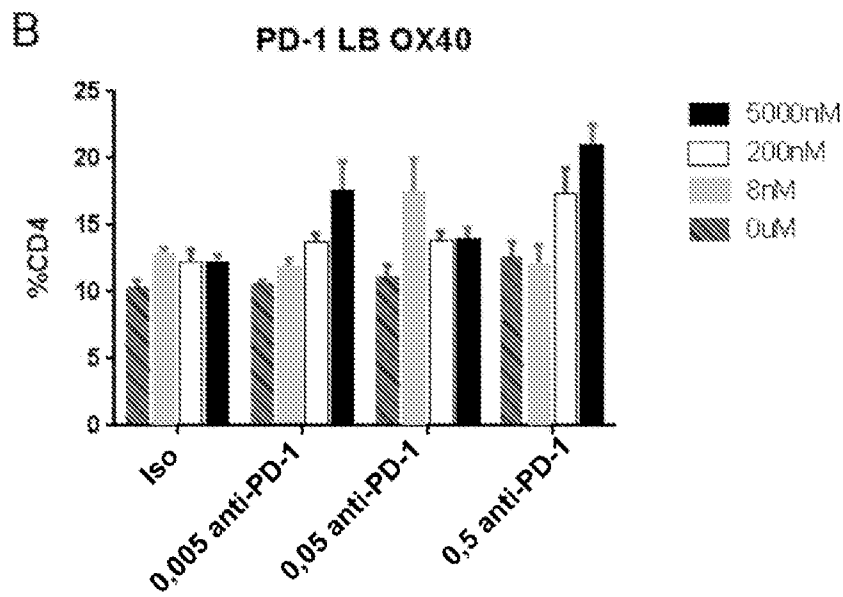
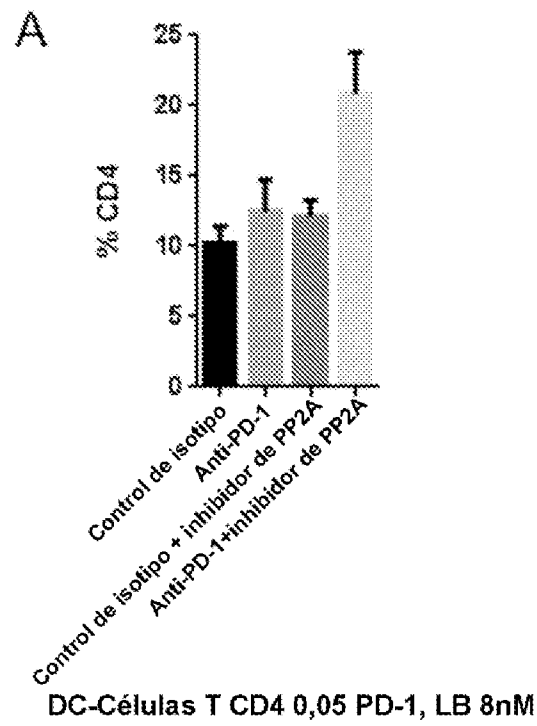
FIGS. 7A-7B



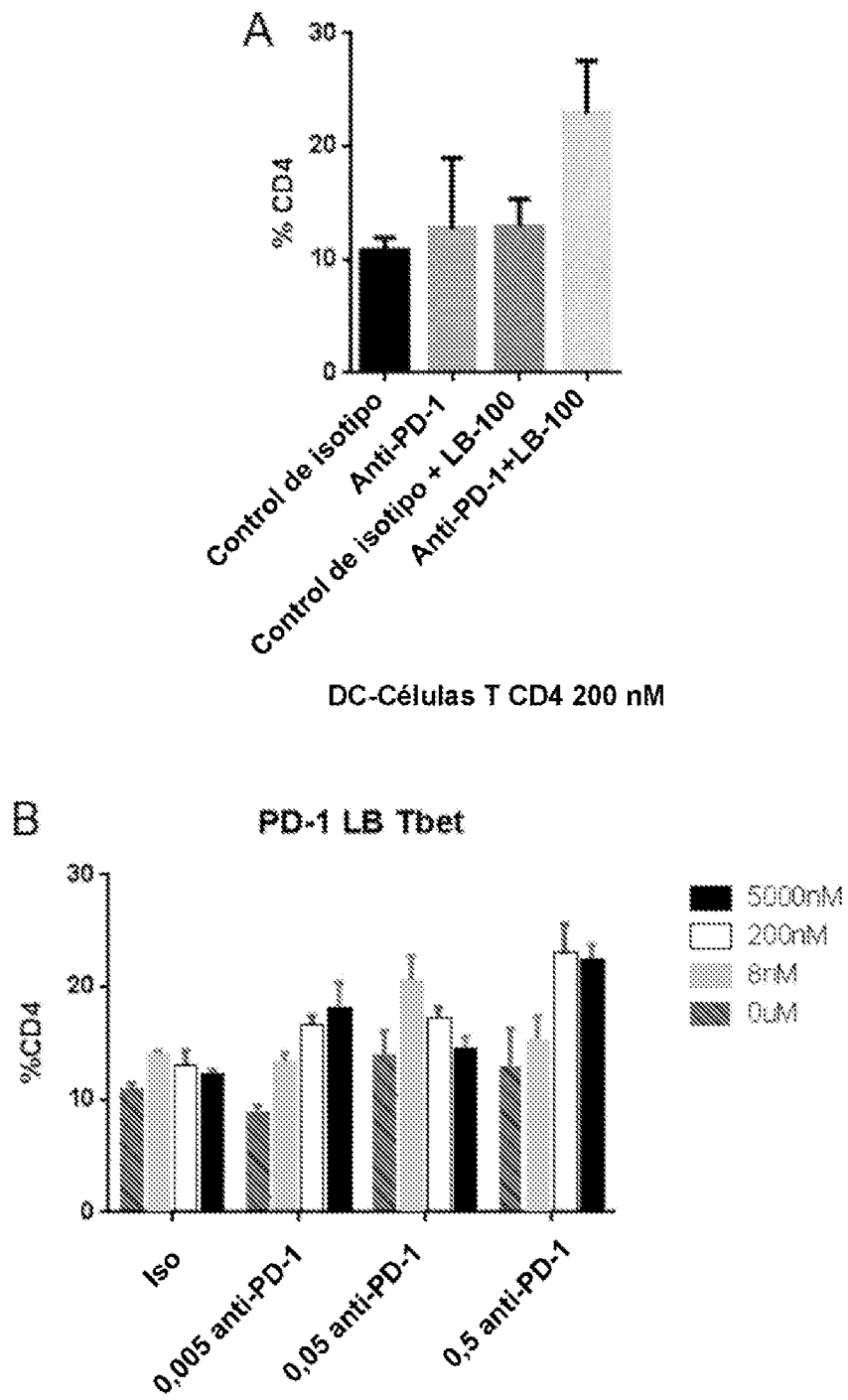
FIGS. 8A-8B



FIGS. 9A-9D



FIGS. 10A-10B



FIGS. 11A-11B

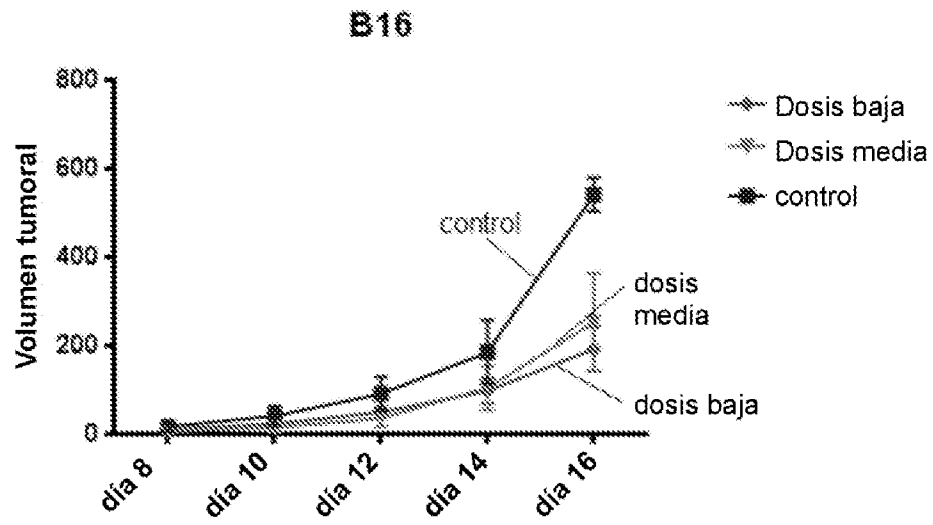
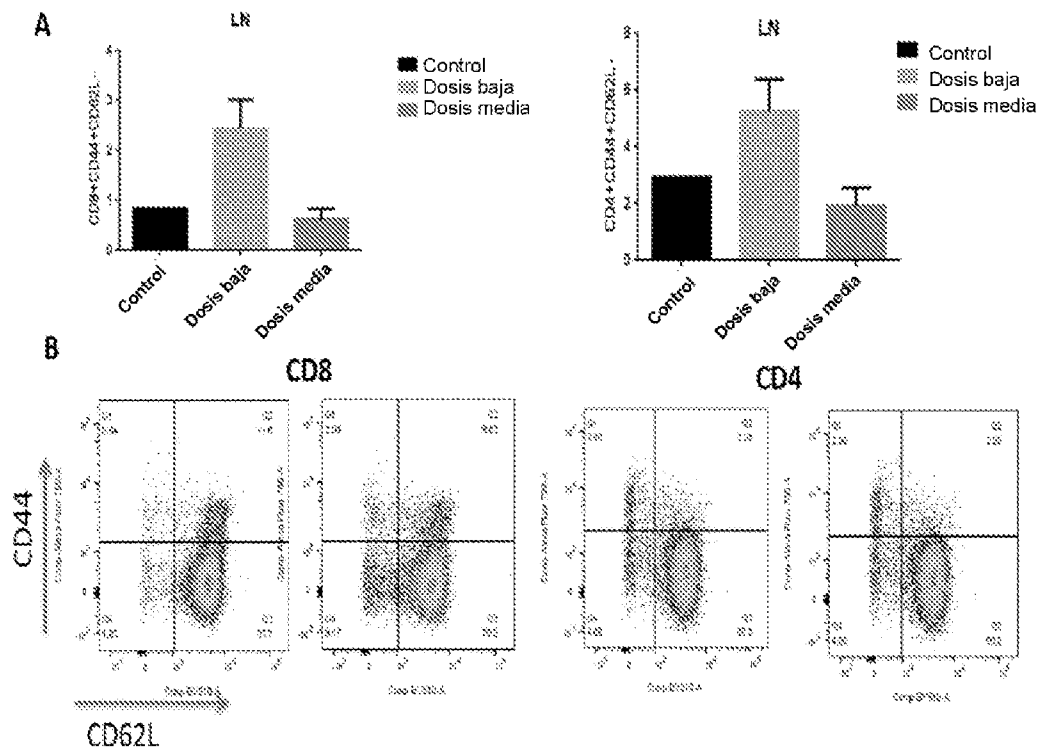
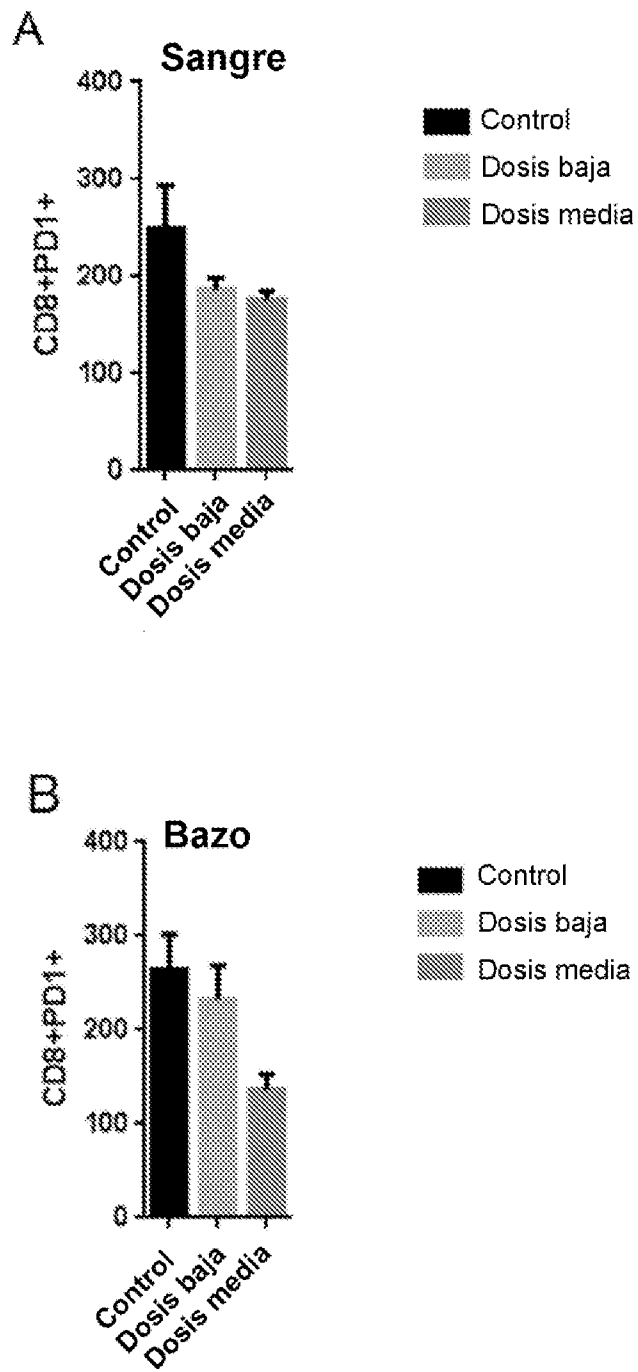


FIG. 12



FIGS. 13A-13B



FIGS. 14A-14B

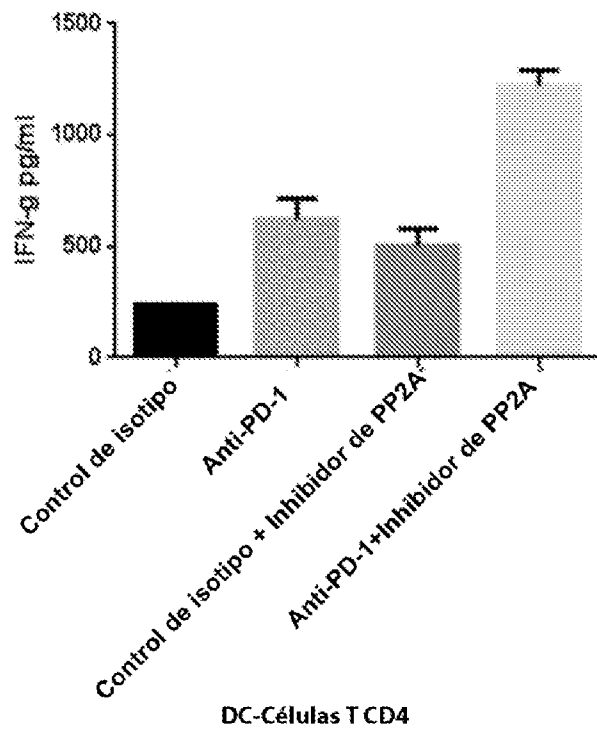
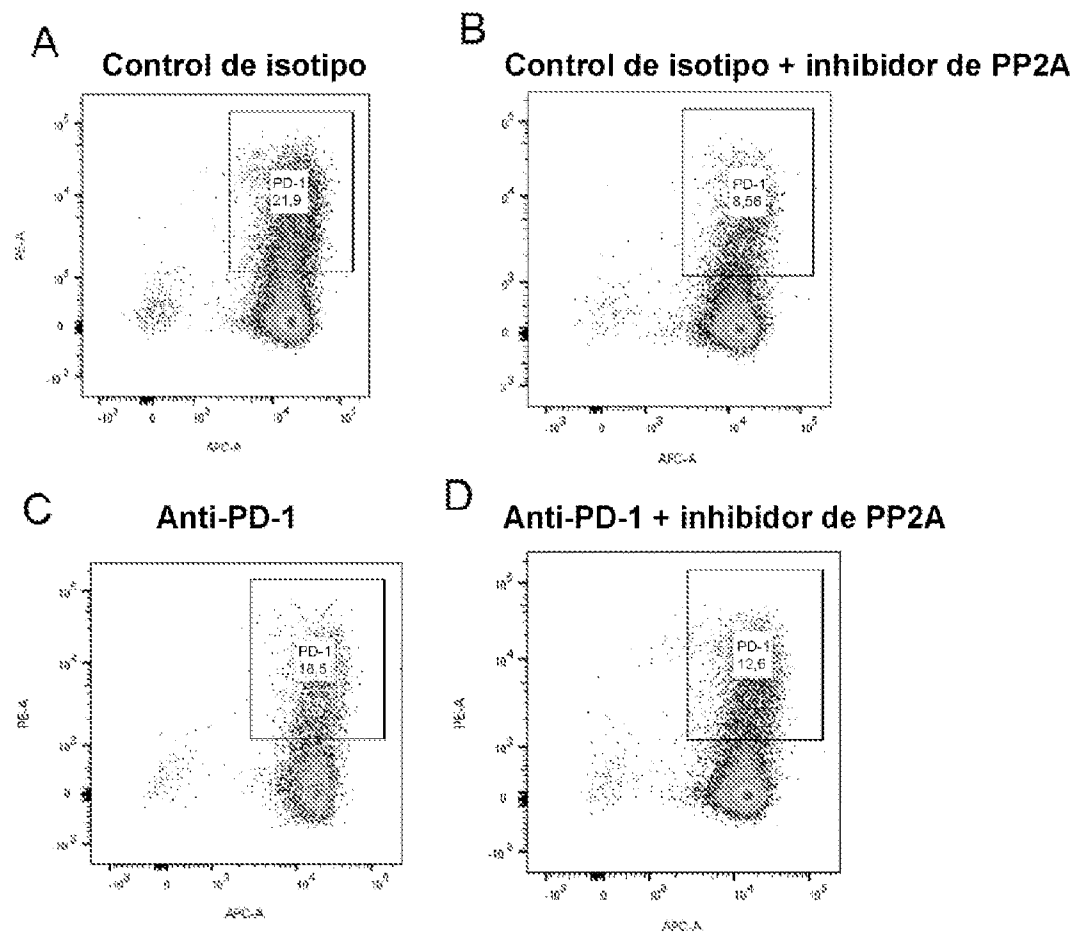
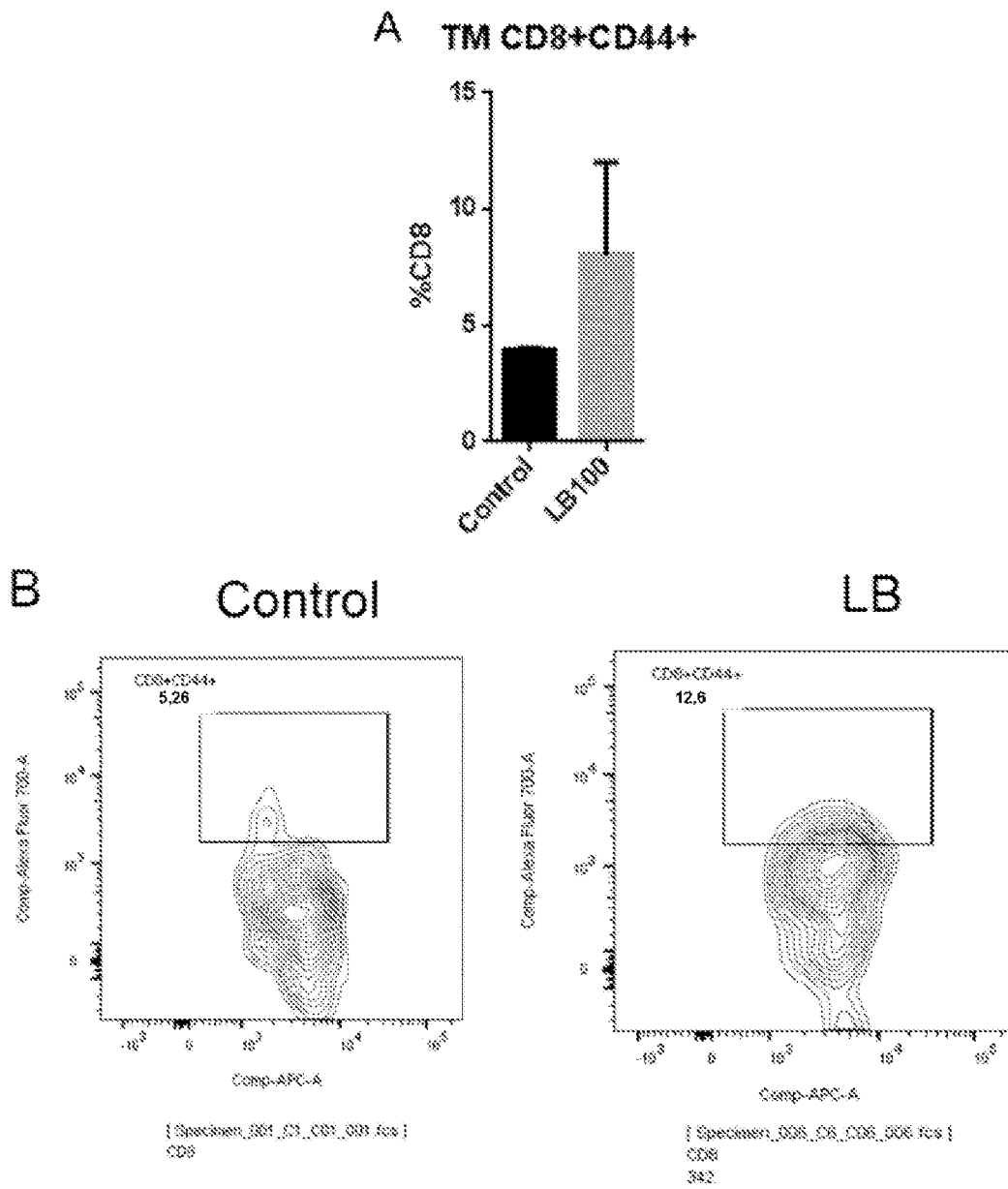


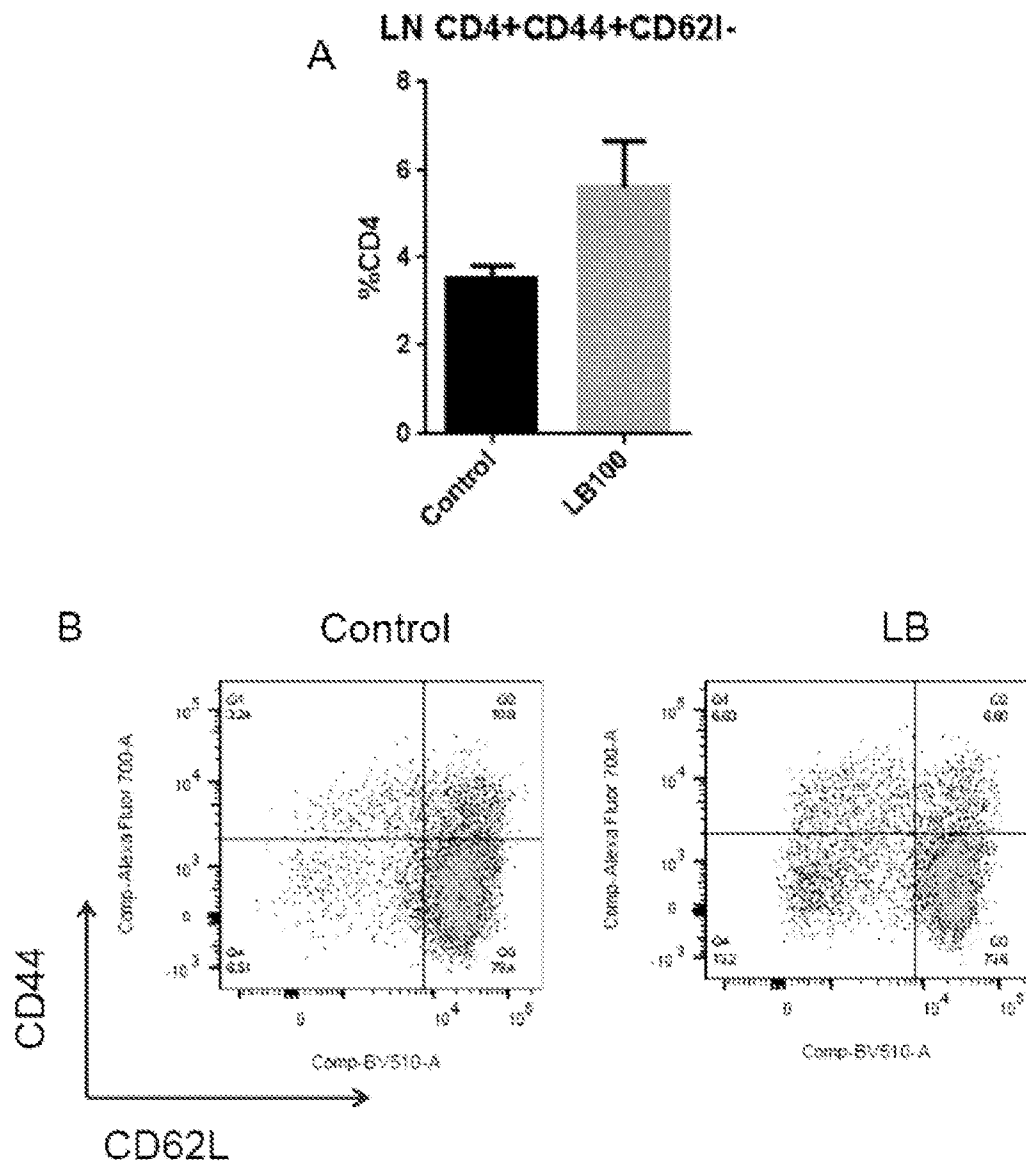
FIG. 15



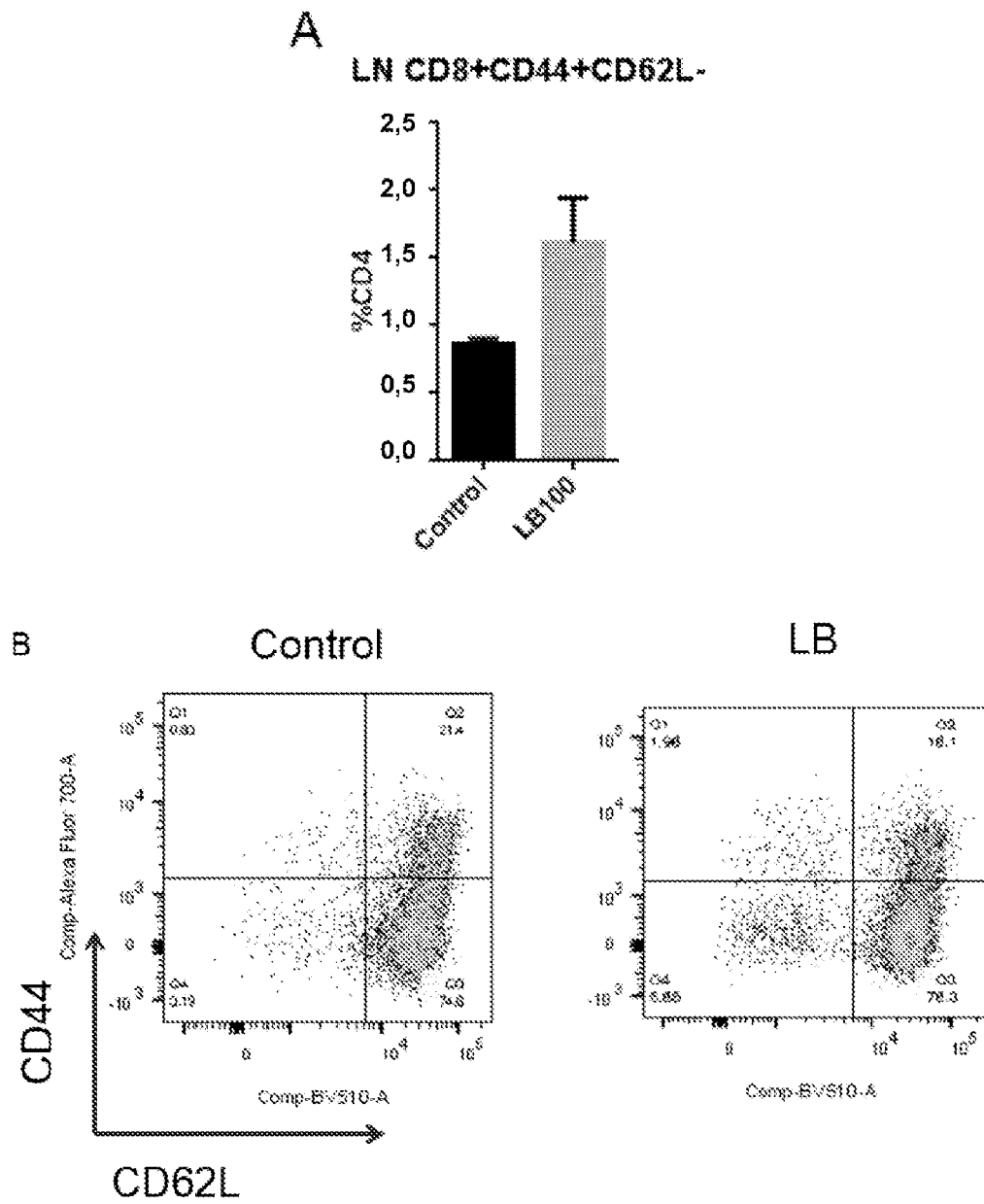
FIGS. 16A-16D



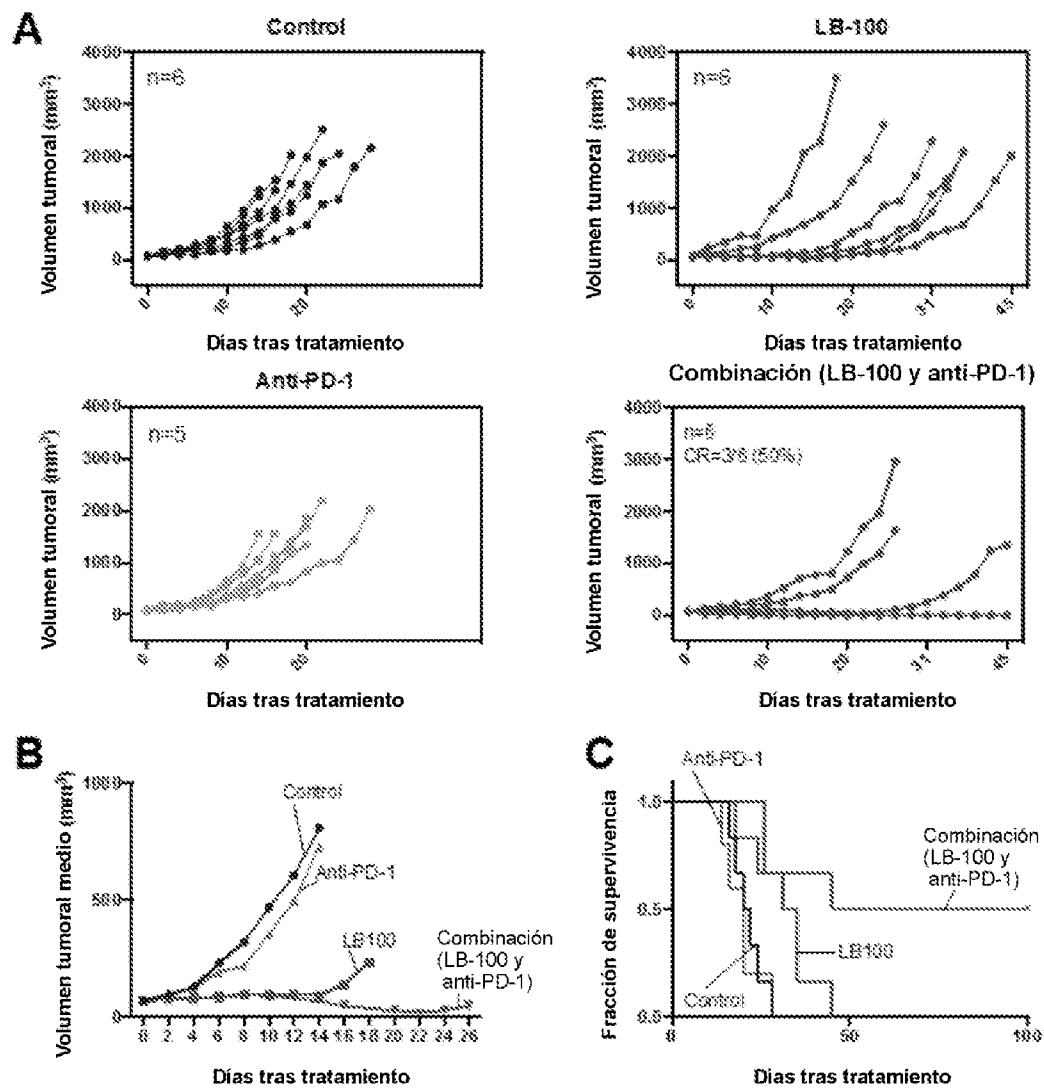
FIGS. 17A-17B



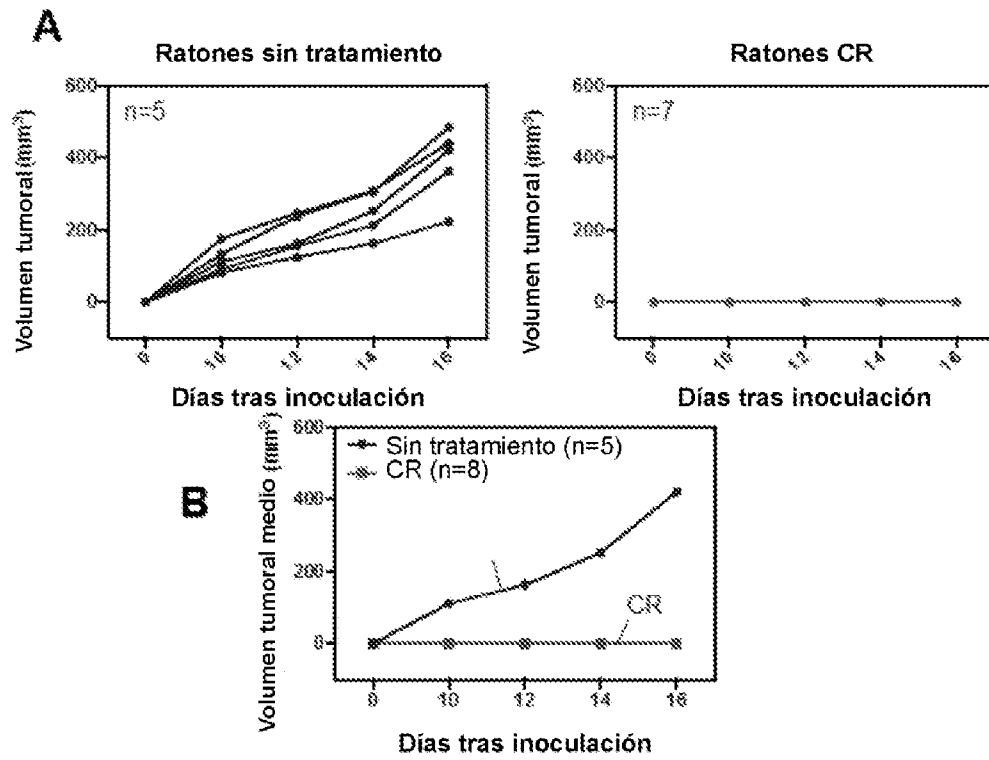
FIGS. 18A-18B



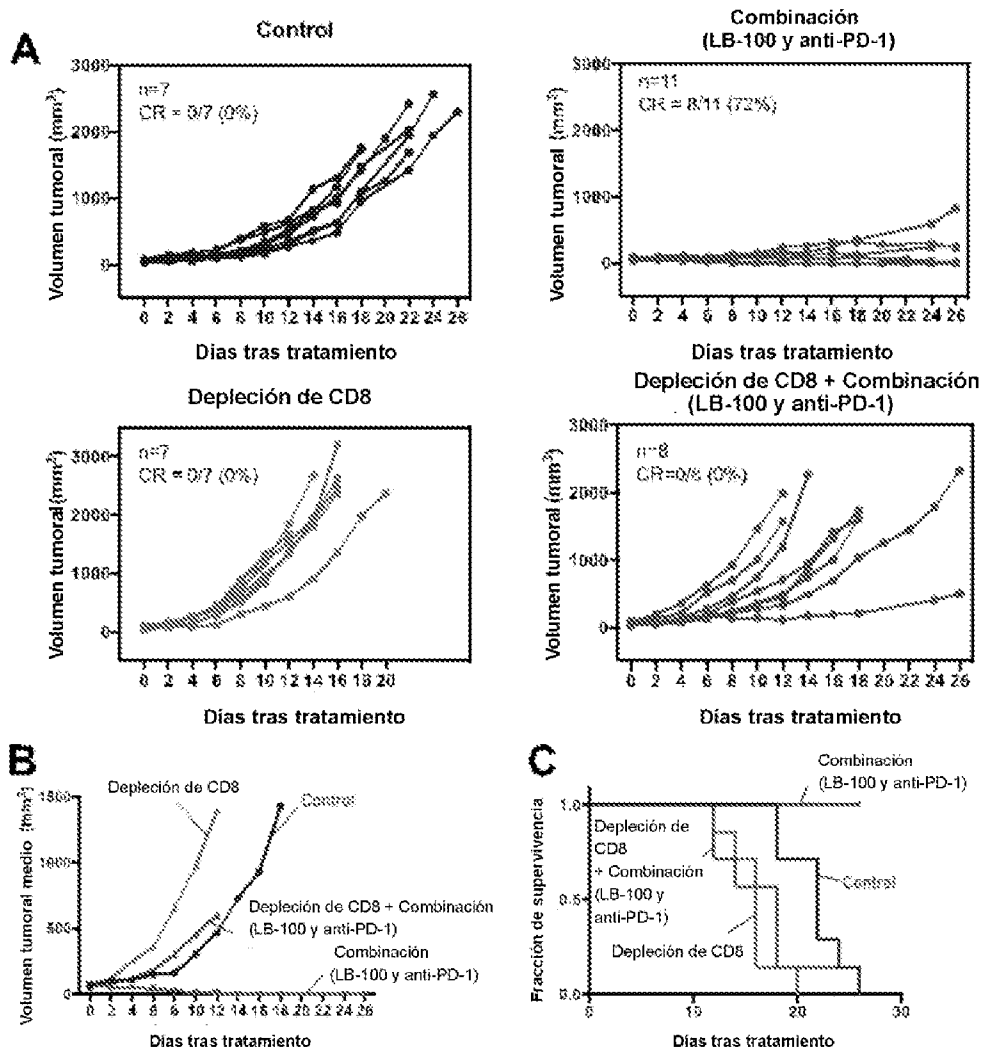
FIGS. 19A-19B



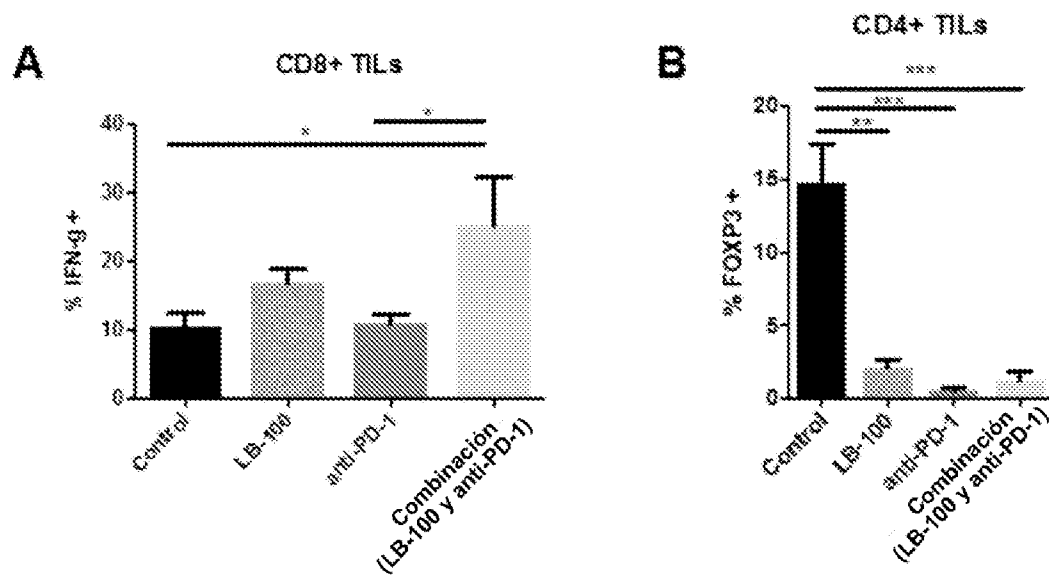
FIGS. 20A-20C



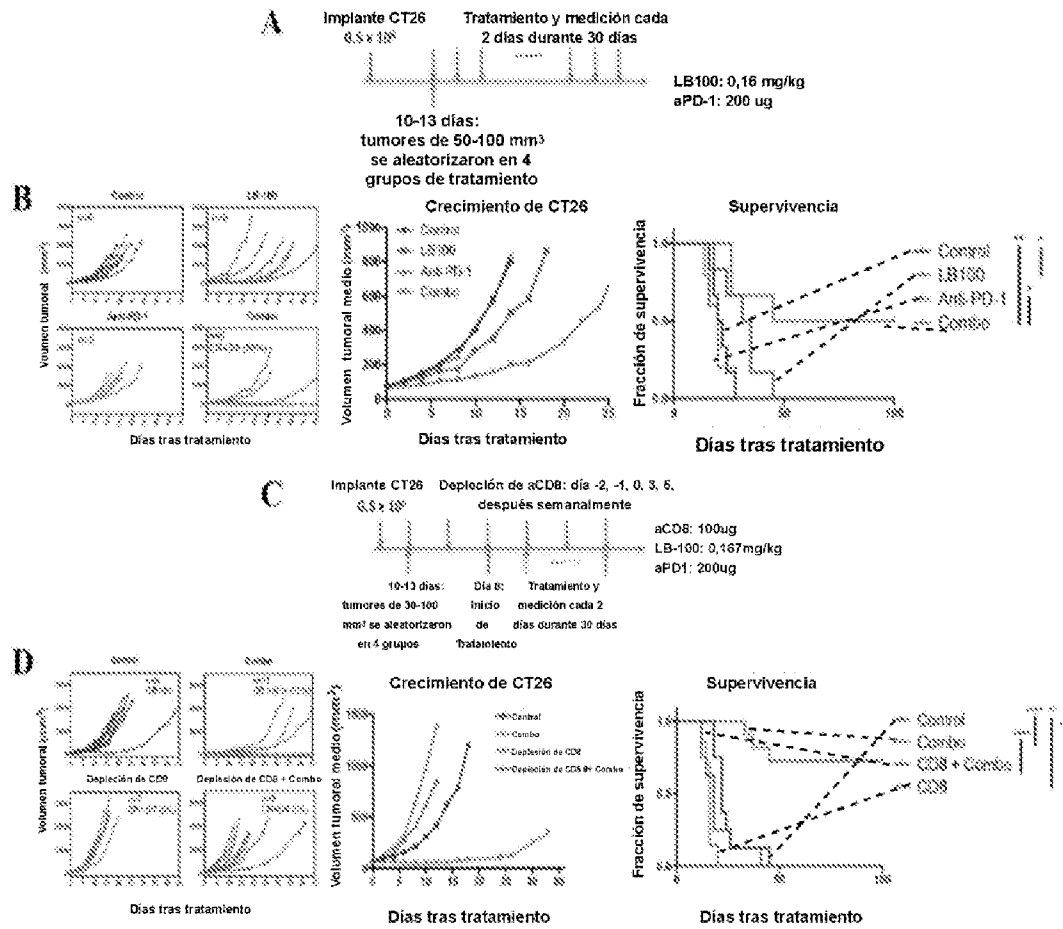
FIGS. 21A-21B



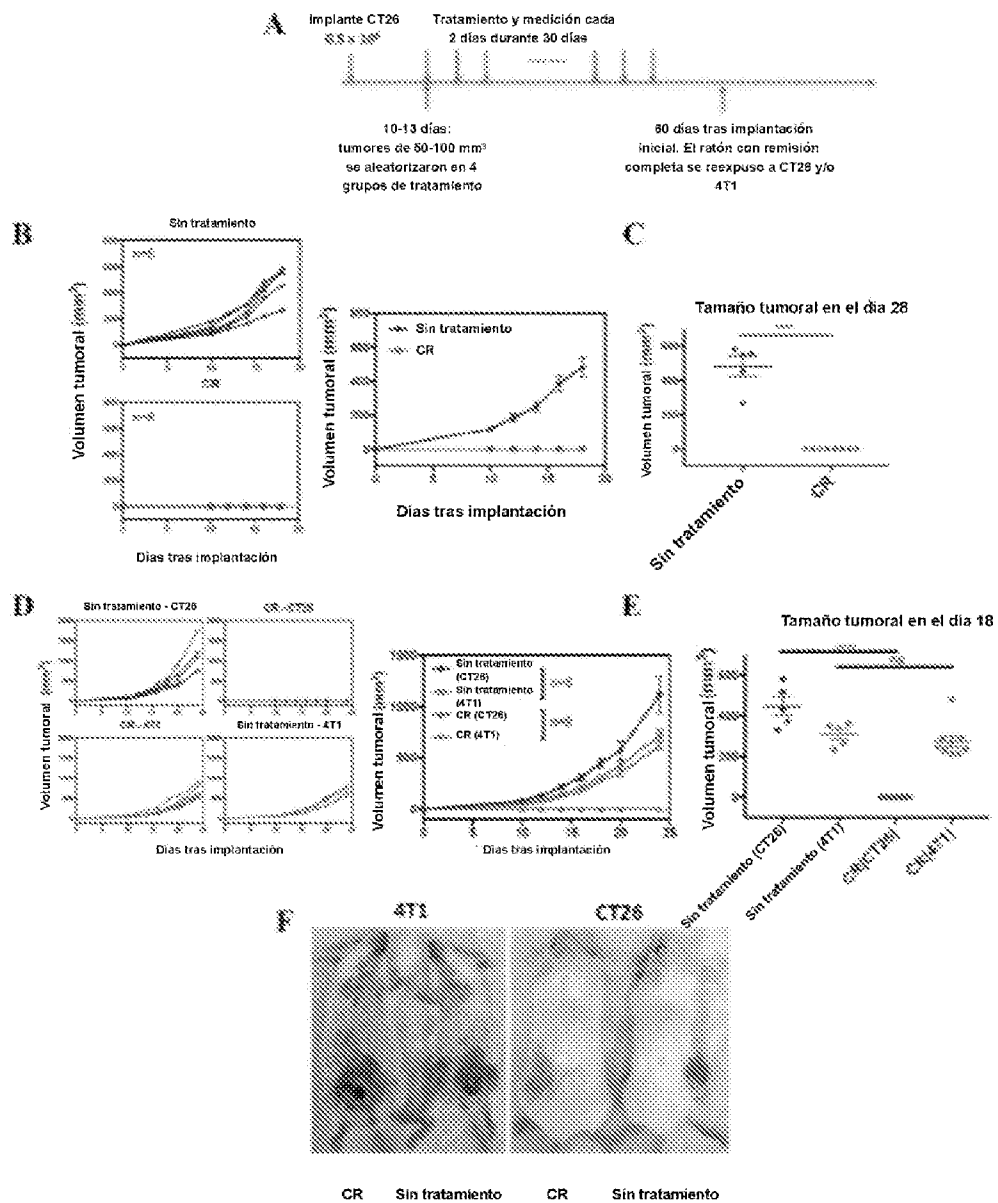
FIGS. 22A-22C



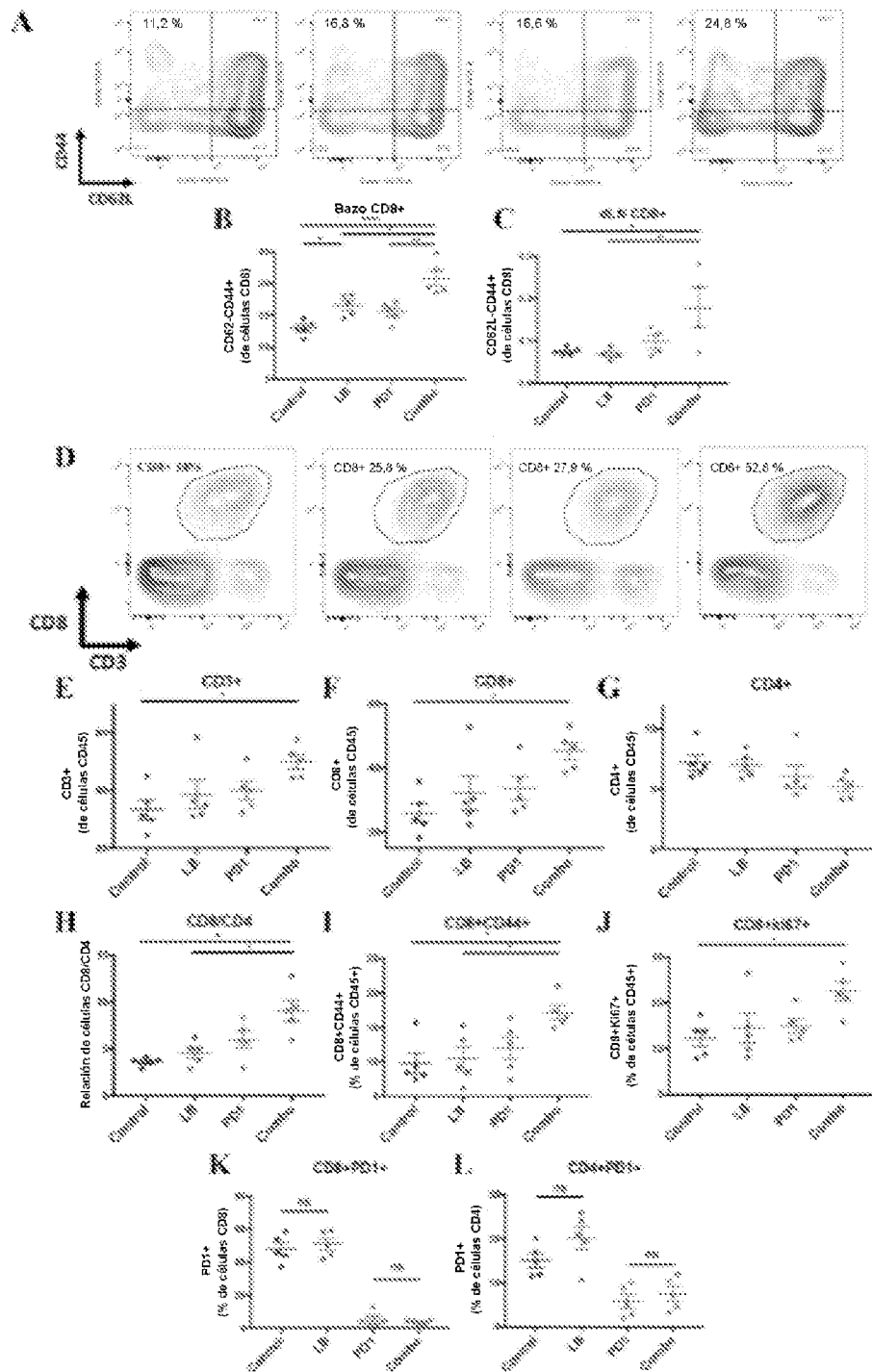
FIGS. 23A-23B



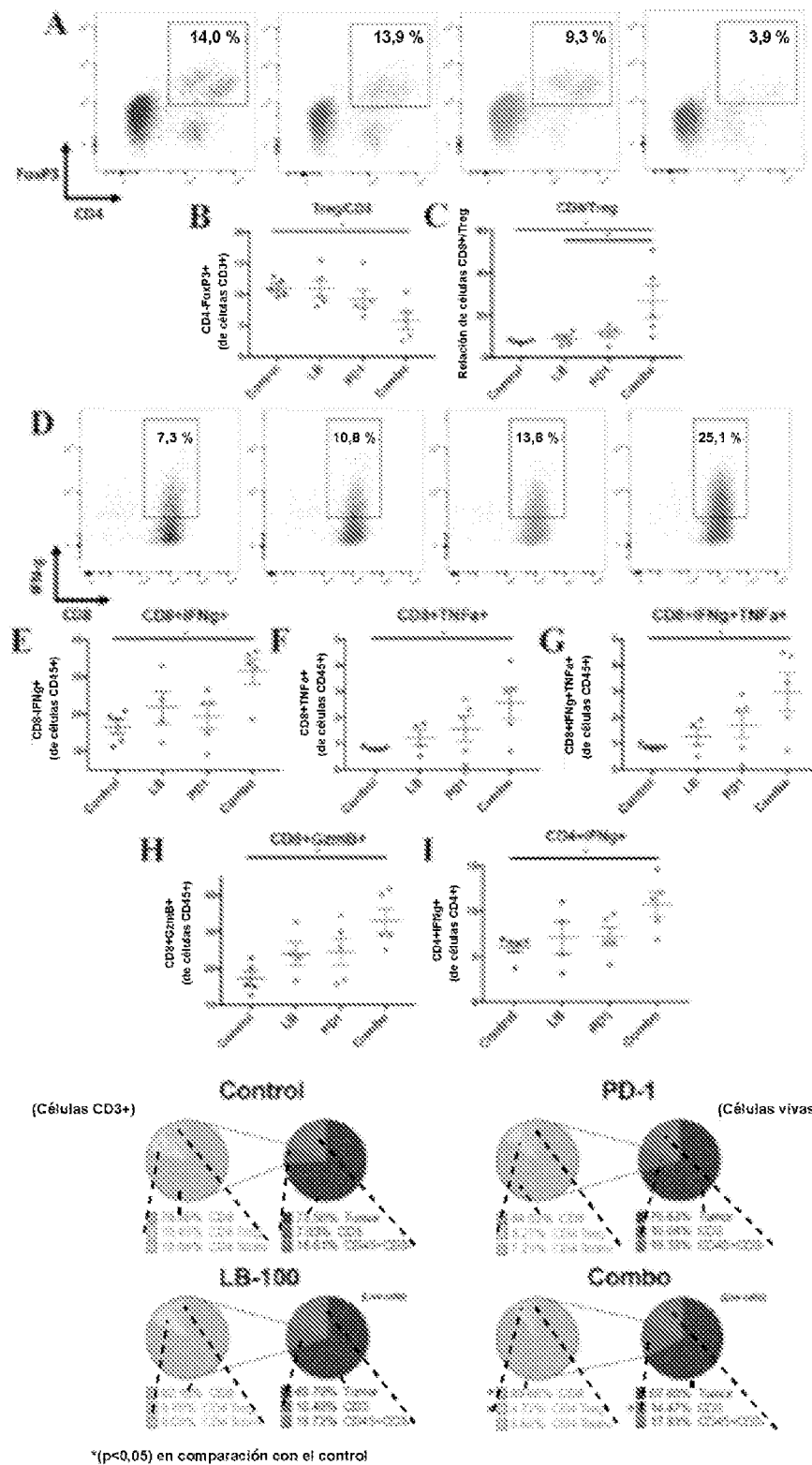
FIGS. 24A-24D

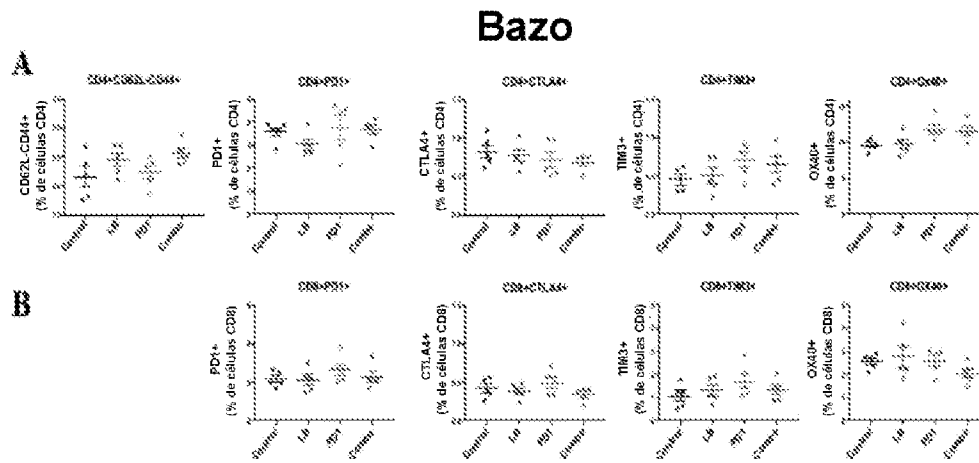


FIGS. 25A-25F

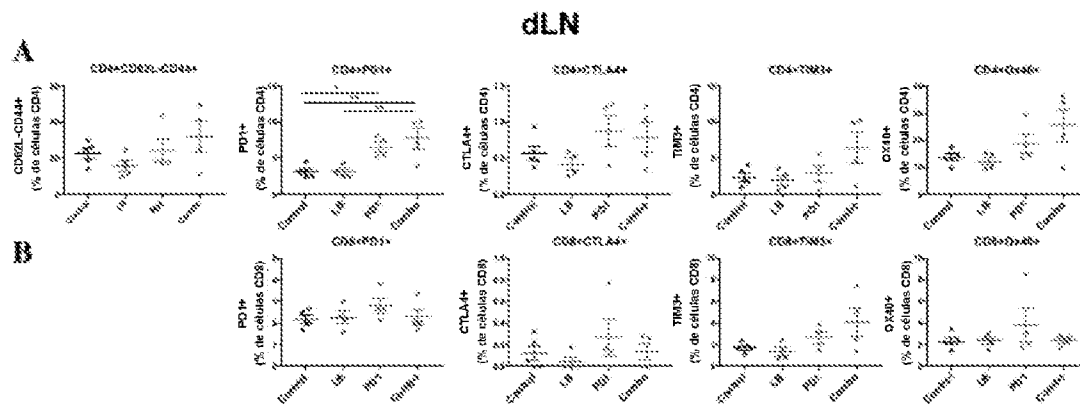


FIGS. 26A-26L





FIGS. 28A-28B



FIGS. 29A-29B

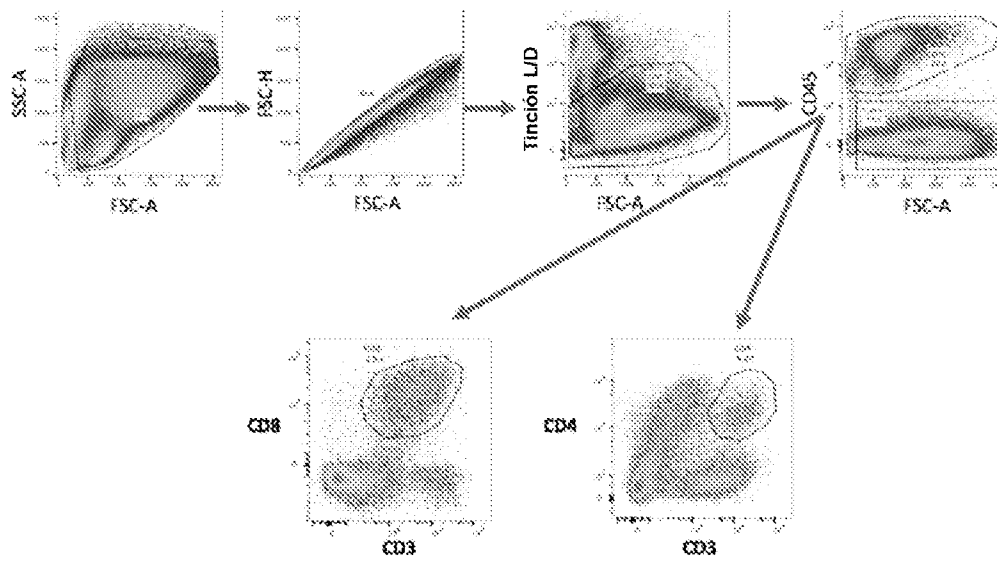
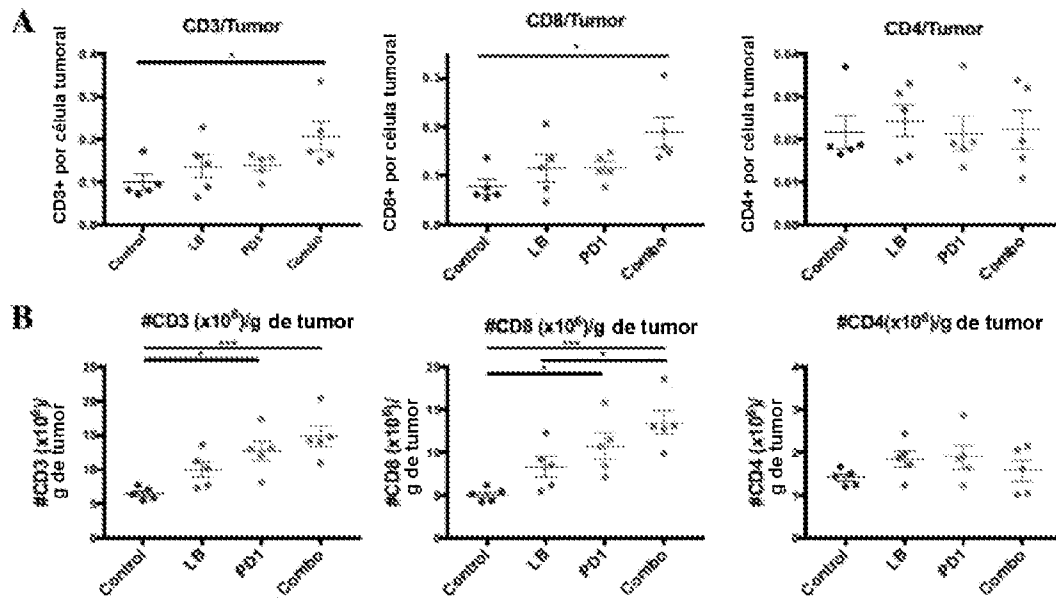
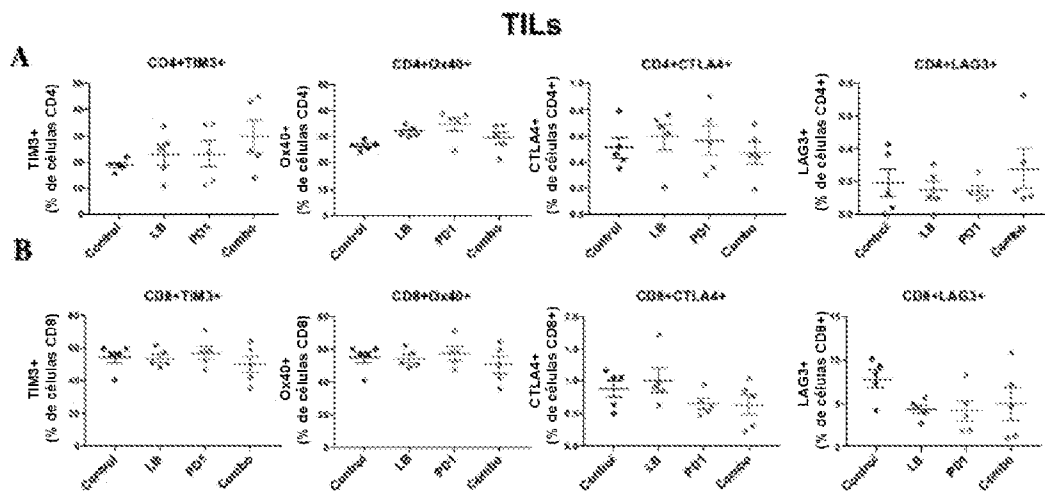


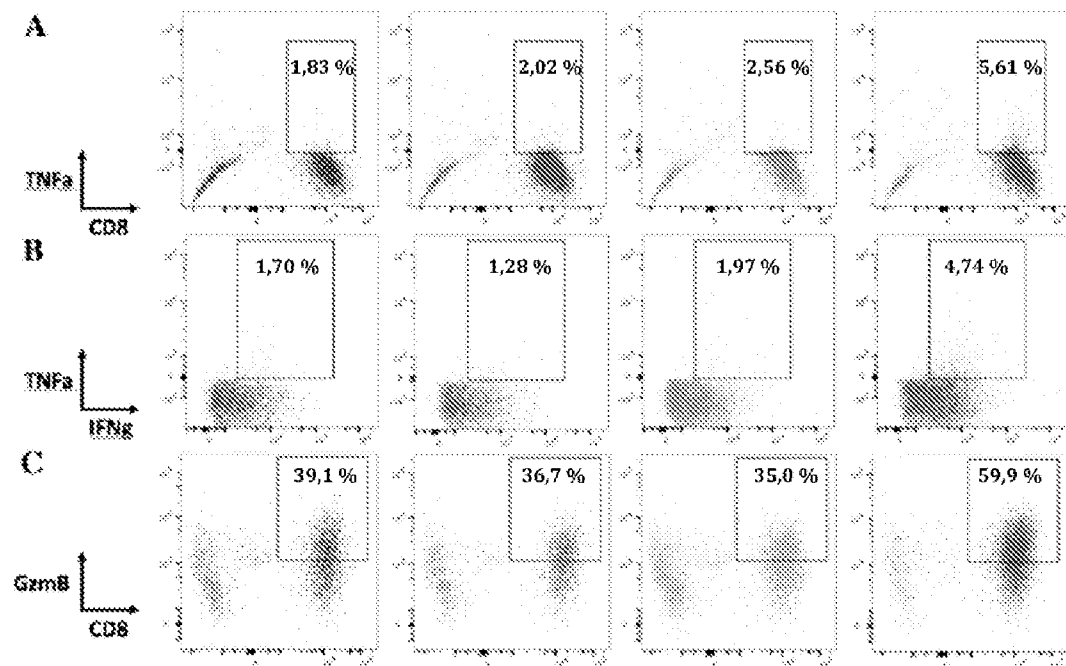
FIG. 30



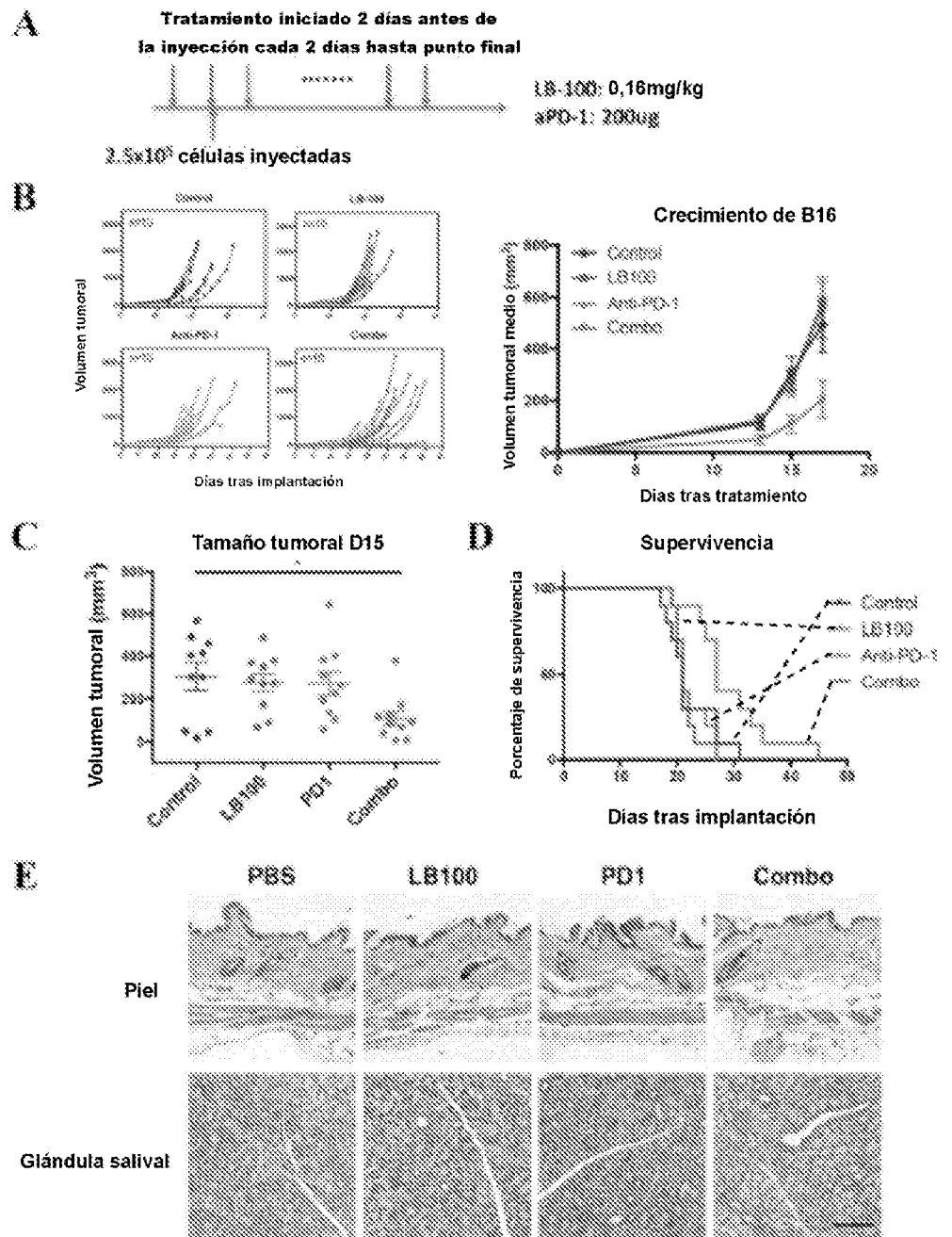
FIGS. 31A-31B



FIGS. 32A-32B



FIGS. 33A-33C



FIGS. 34A-34E

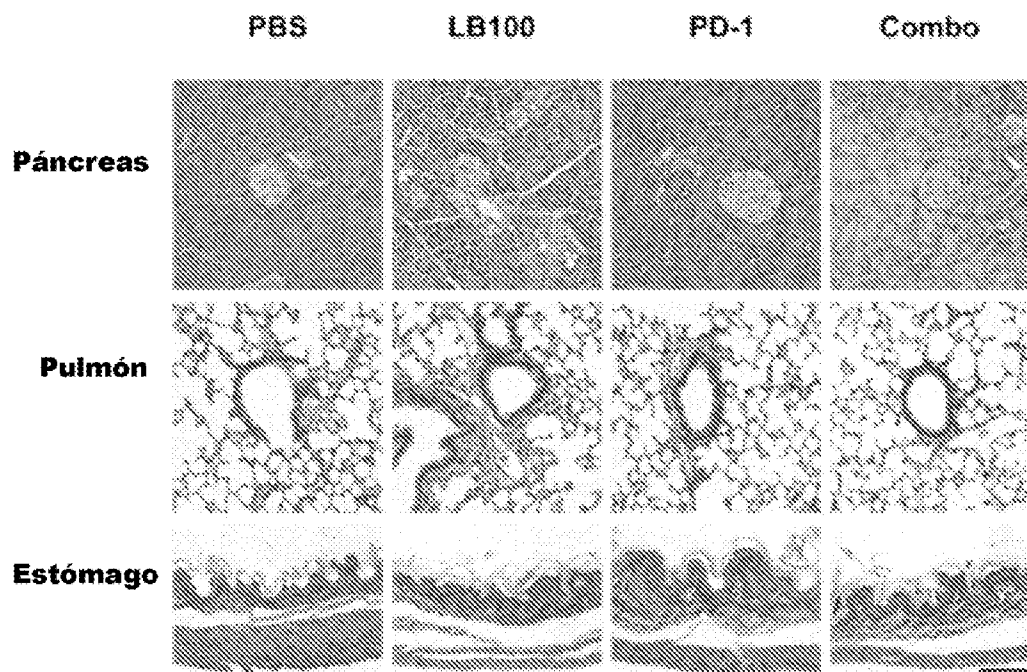
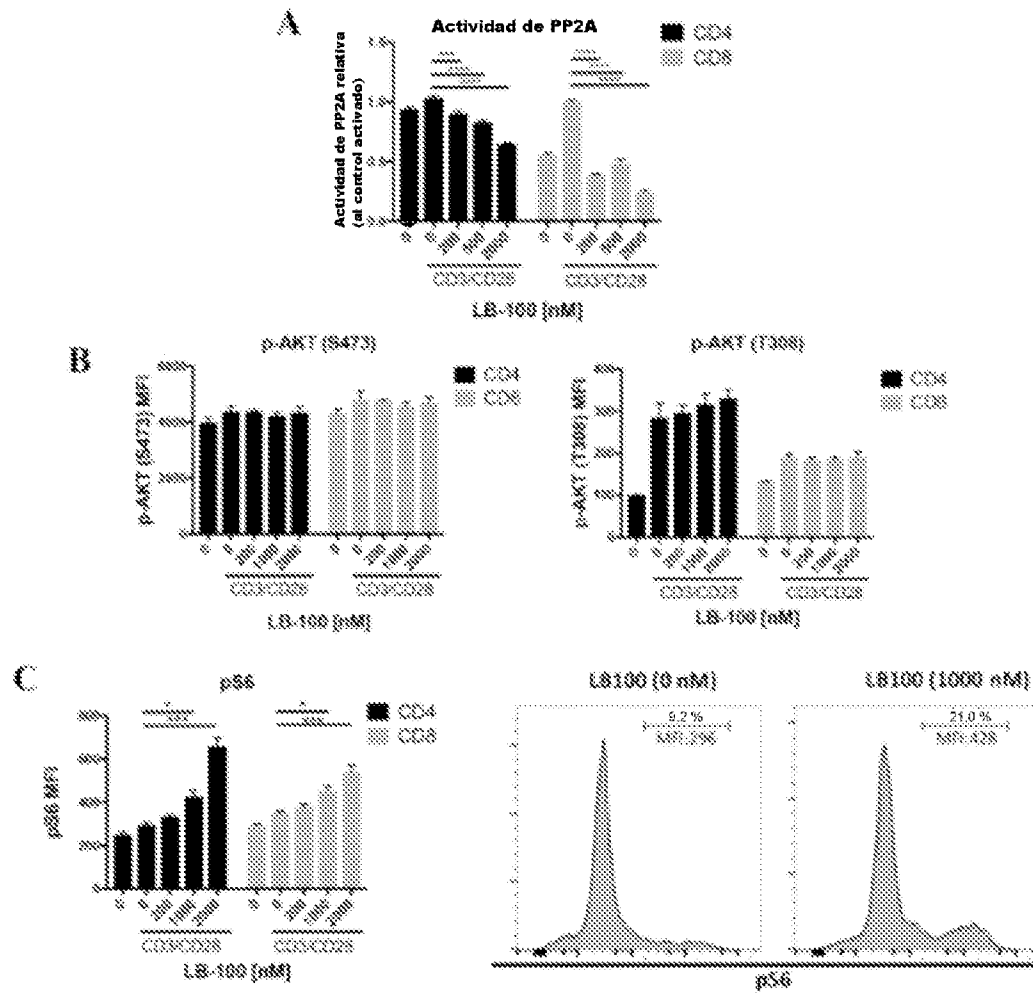


FIG. 35



FIGS. 36A-36C

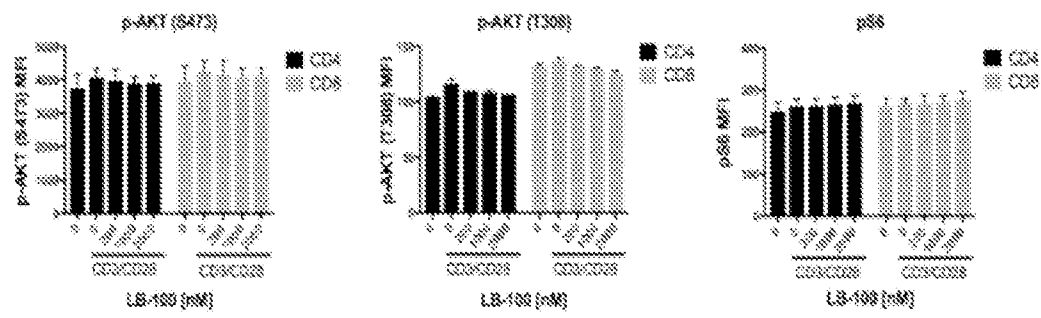
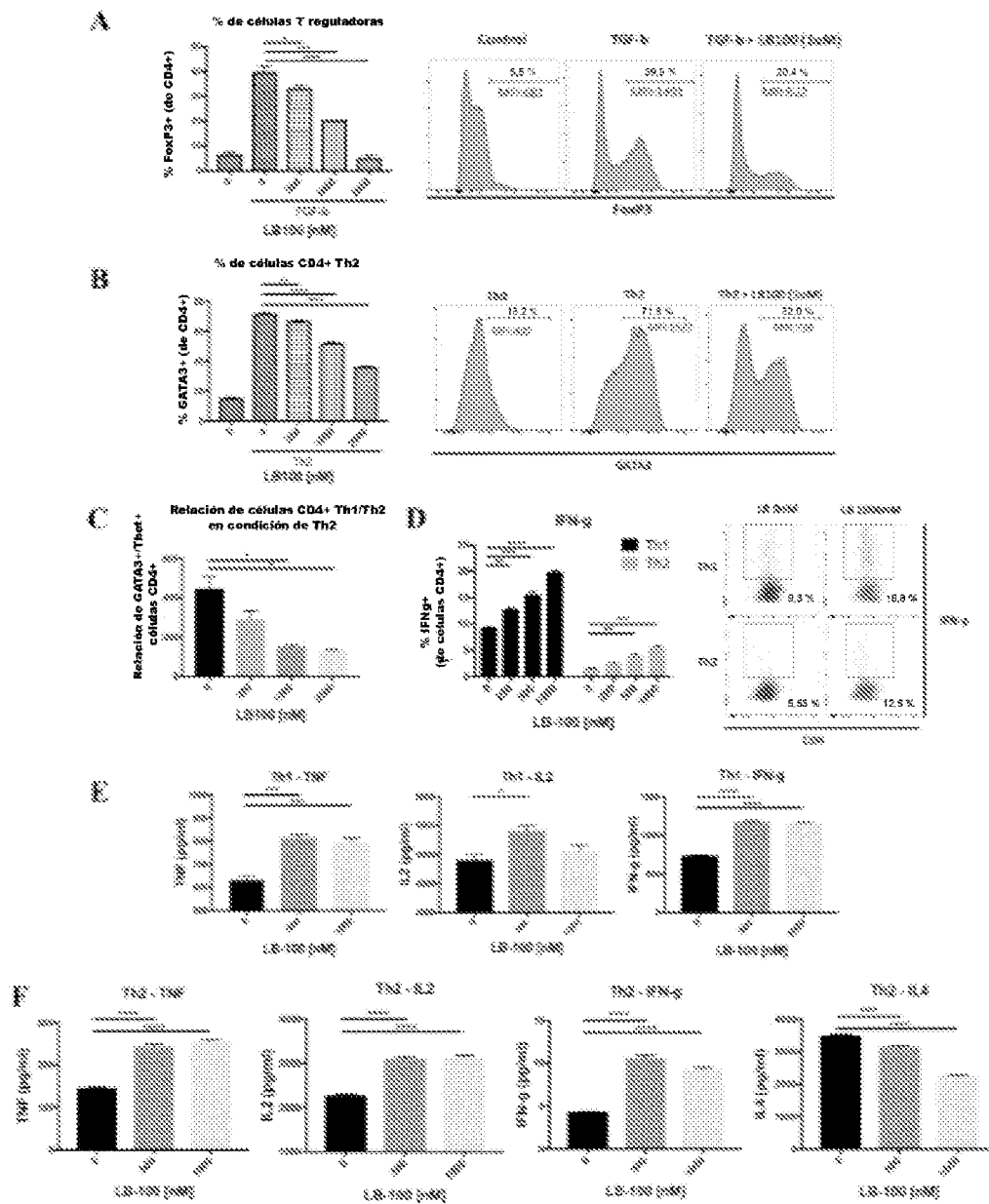
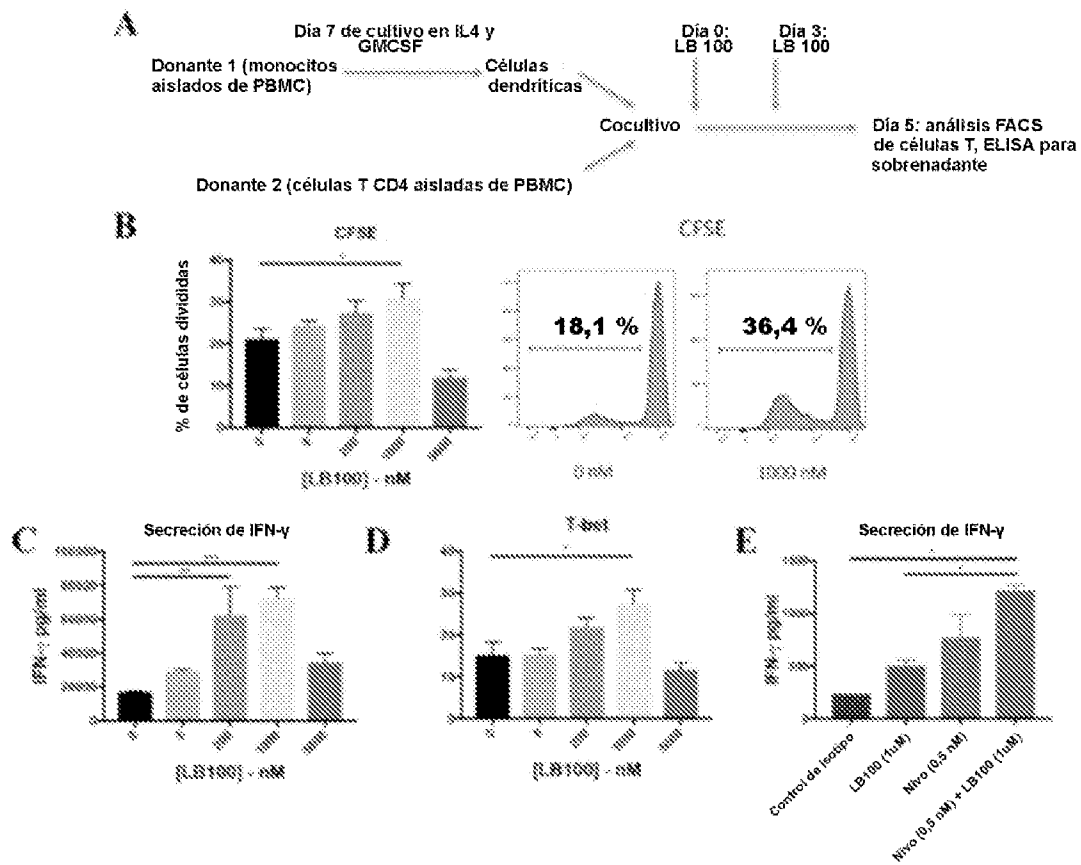


FIG. 37



FIGS. 38A-38F



FIGS. 39A-39E