

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 710**

51 Int. Cl.:

A61K 31/661 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2003 E 03745031 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 1490072**

54 Título: **Nuevo uso terapéutico de LPC, ligandos agonistas específicos para el receptor G2A**

30 Prioridad:

25.03.2002 KR 2002016029

22.08.2002 KR 2002049766

21.10.2002 KR 2002064308

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

27.05.2015

73 Titular/es:

ARIMED INC. (100.0%)

Byeoksan Digital Valley Suite 1004 Mullae-dong

5-ga 9 Youngdeungpo-gu

Seoul 150-095, KR

72 Inventor/es:

KIM, YUNG-HI;

SONG, DONG-KEUN;

SUH, HONG-WON y

HUH, SUNG-OH

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 536 710 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

Nuevo uso terapéutico de LPC, ligandos agonistas específicos para el receptor G2A

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un nuevo uso terapéutico de ligandos agonistas específicos para el receptor G2A, y más particularmente al tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la acumulación o hiperactividad de neutrófilos y/o a la liberación excesiva de IL-8, o de una enfermedad infecciosa en un sujeto, que comprende administrar LPC (lipofosfatidilcolina) al sujeto.

Antecedentes de la invención

10 La inflamación es una respuesta de defensa importante del organismo frente a patógenos, sustancias extrañas y lesiones en los tejidos. La inflamación viene acompañada de síntomas sistémicos tales como fiebre, debilidad, pérdida de apetito y escalofríos, o síntomas locales tales como enrojecimiento, hinchazón, dolor y disfunción. La inflamación se divide en inflamación aguda, inflamación subaguda e inflamación crónica según su duración. La reacción de inflamación aguda se produce en los vasos sanguíneos y está mediada principalmente por neutrófilos. Especialmente, en el caso de inflamación supurativa, se observa un importante incremento de neutrófilos. La inflamación crónica continúa durante varias semanas o varios meses. Se diferencia de la inflamación aguda en que la lesión y la recuperación de los tejidos se produce al mismo tiempo ("Robbins Pathological Basis of Disease", de R.S. Cotran, V. Kumar y S.L. Robbins, W. B. Saunders Co., pág. 75, 1989). Aunque la inflamación crónica puede derivar directamente de una inflamación aguda, generalmente es el resultado de infecciones continuas que provocan reacciones hipersensitivas prolongadas (p.ej., tuberculosis, sífilis, infección fúngica), exposición continuada a endotoxinas (p.ej., aumento de lípidos en plasma) o exotoxinas (p.ej., sílice, asbesto, alquitrán, suturas quirúrgicas), o respuesta autoinmune contra tejidos propios (p.ej., artritis reumática, lupus sistémico eritematoso, esclerosis múltiple, soriasis) y por tanto puede iniciarse con un comienzo engañoso que progrese con el tiempo. Por consiguiente, la inflamación crónica incluye numerosos síntomas médicos tales como artritis reumática, restenosis, soriasis, esclerosis multicéntrica, sinequia quirúrgica, tuberculosis y enfermedades pulmonares inflamatorias crónicas (p.ej., asma, neumoconiosis, enfermedad pulmonar oclusiva crónica, fibrosis pulmonar). La inflamación subaguda se refiere a una inflamación que está entre las inflamaciones aguda y crónica.

Como enfermedades inflamatorias principales, están la rinitis y la sinusitis tales como la rinitis infecciosa, la rinitis alérgica, la rinitis crónica, la sinusitis aguda y la sinusitis crónica; la otitis media tal como la otitis media purulenta y la otitis media purulenta crónica; la neumonía tal como la neumonía bacteriana, la bronconeumonía, la neumonía lobar, la neumonía de *Legionella* y la neumonía vírica; la gastritis aguda o crónica; la enteritis tal como la enterocolitis infecciosa, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa idiopática y la colitis pseudomembranosa; y la artritis tal como la artritis piogénica, la artritis tuberculosa, la artritis degenerativa y la artritis reumatoide. Adicionalmente, está la sepsis que acompaña a una reacción inflamatoria sistémica extrema en etapa inicial. Dicha sepsis es el resultado de una reacción excesiva de los hospedantes frente a endotoxinas de bacterias gram negativas, etc. En las técnicas anteriores, para tratar la sepsis, se han utilizado antibióticos y preparaciones de esteroides, pero sus efectos son débiles y por tanto las tasas de mortandad de hospedantes debidas a septicemia siguen siendo elevadas.

Asimismo, una inflamación excesiva provoca una lesión permanente de los tejidos circundantes, y el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) se considera una de las enfermedades inflamatorias típicas que son el resultado de una lesión de tejido por una inflamación excesiva. El SDRA es una insuficiencia respiratoria hipoxémica aguda debida a un edema pulmonar originado por un aumento de la permeabilidad de la barrera capilar alveolar. Es considerado el caso más grave de lesión pulmonar aguda (LPA). Los síntomas clínicos que conducen a los pacientes a un riesgo de SDRA son diversos, por ejemplo, traumas, hemorragias o septicemia, y el SDRA es el resultado de una reacción de inflamación sistémica excesiva producida por dichos síntomas. Incluso aunque se han llevado a cabo tratamientos tales como el tratamiento de hipoxia, la intubación endotraqueal, la ventilación mecánica, etc., la tasa de mortandad debida a SDRA sigue siendo del 50~70%. Se sabe que las células inflamatorias en circulación, especialmente los neutrófilos, desempeñan una función importante en el inicio y desarrollo de la lesión pulmonar aguda, p.ej., edema pulmonar, reacción de inflamación, etc. (Abraham et al., *Am. J. Physiol.*, 279, L1137-L1145, 2000). Varios científicos han demostrado que los neutrófilos se acumulan extensivamente en los pulmones de pacientes de SDRA (Weinacker & Vaszar, *Annu. Rev. Med.*, 52: 221-37, 2001). Dichos neutrófilos, una vez activados, descargan proteasas que incluyen las metaloproteinasas de matriz y otros mediadores que provocan la lesión pulmonar aguda. Por tanto, si se suprime la acumulación de neutrófilos en los pulmones, se puede tratar el SDRA debido a lesión pulmonar aguda.

El síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) es una enfermedad que resulta de la complicación de una sepsis, etc. Como ejemplos de SDMO, se pueden incluir el fallo hepático agudo, el fallo renal agudo, el fallo pulmonar, la hemorragia gastrointestinal, etc. Para el tratamiento de SDMO, se han usado preparaciones de antibióticos y esteroides, sin embargo sus efectos fueron débiles.

Por otro lado, los neutrófilos (también denominados "leucocitos polimorfonucleares" (PMNs, del inglés "polymorphonuclear leucocytes") son células fagocíticas que desempeñan una función importante en el mecanismo

de defensa del hospedante, y suponen aproximadamente el 60% de los leucocitos que circulan por el cuerpo. La membrana de los neutrófilos tiene receptores para factores de crecimiento hemopoiéticos tales como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos), etc., proteínas G implicadas en la transducción de señal asociada a receptores para opsonina y factores quimiotácticos, canales iónicos asociados al intercambio iónico de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , etc., enzimas y fosfolípidos. También, en la superficie de los neutrófilos, existen receptores Fc contra un anticuerpo IgG tal como CD16 y CD32 y receptores de proteínas de complemento C3 tales como CR1 y CR3. Por consiguiente, los antígenos unidos a ellos pueden ser reconocidos fácilmente y eliminados. Dentro de los gránulos de neutrófilos, existe una defensina asociada a la desinfección tal como peroxidasa, lactoferrina, receptor de adhesión de leucocitos y fosfatasa alcalina, y proteína de incremento de la permeabilidad/bactericida (BPI), que destruyen agentes infecciosos o están implicados en los procesos de la reacción inflamatoria. Además, los neutrófilos expresan proteínas de adhesión celular tales como CD11a/CD18(LFA-1), selectina, etc., que desempeñan una función importante en el movimiento de neutrófilos en la reacción inflamatoria.

Para un adulto normal, se producen neutrófilos en una cantidad de $0,85-1,6 \times 10^9$ células/kg/día. Tras ser producidas y diferenciadas en la médula ósea a lo largo de aproximadamente 14 días, pasan a la sangre periférica y circulan ahí durante aproximadamente 6 horas. Entonces penetran en los tejidos y mueren o se pierden en las membranas mucosas tras sobrevivir durante varios días en los tejidos. Los neutrófilos tienen una vida media corta, de aproximadamente 6-10 horas, y son eliminados en los macrófagos por apoptosis. La apoptosis de neutrófilos se produce espontáneamente o por estímulos externos. Como ejemplo típico de estímulo externo, se puede mencionar un mecanismo Fas. Fas es una sustancia similar al receptor de TNF que existe en la superficie de los neutrófilos, e induce la apoptosis a través de un mecanismo FADD en las células una vez que ha sido estimulado por un ligando Fas. Se sabe que la caspasa tiene una función importante en dicho mecanismo. Se sabe que la apoptosis de neutrófilos se ve retardada o suprimida por diversos mediadores de la inflamación. Algunos trabajos propusieron que el retraso (supresión) de la apoptosis de neutrófilos observado en SDRA se debe a GM-CSF. Sin embargo, el mecanismo de transducción intracelular que retrasa la apoptosis de neutrófilos apenas era conocido. Es decir, en varias enfermedades inflamatorias, diversos mediadores de la inflamación suprimen la apoptosis de neutrófilos que se está produciendo fisiológica y activamente, y por consiguiente, se produce una reacción inflamatoria continua por una acumulación de neutrófilos excesiva que produce daños en los tejidos circundantes. Como mediadores de inflamación, se han identificado G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-2, IL-6, etc., que son factores endógenos, así como LPS (liposacárido) que deriva del exterior del organismo.

Recientemente, se están desarrollando numerosos estudios sobre LPC (lisofosfatidilcolina) y SPC (esfingosilfosforilcolina) que tiene LPA (ácido lisofosfatídico) o S1P (esfingosina 1-fosfato), que es conocido como transmisor de lípidos, y una colina unida al mismo. Se sabe que la LPC y la SPC desempeñan una función importante no solo como intermedios en la biosíntesis de membranas celulares, junto con LPA y S1P, sino también como moléculas de señalización (Fukushima, N. et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41: 507-534, 2001). Se unen a sus receptores e inducen varias reacciones celulares tales como proliferación celular, diferenciación celular, movimiento celular, muerte celular, etc., a través de diversas transducciones de señal (Lynch, K. R. et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, 20(12): 473-475, 1999). Los receptores a los que se unen son un tipo de receptores que se clasifican como receptores acoplados a proteína G. Puesto que el OGR-1 (receptor 1 acoplado a proteína G huérfano) se encontró por primera vez como receptor de SPC (Xu, Y. et al., *Nat. Cell. Biol.*, 2(5): 264-267, 2000), se han llevado a cabo estudios para identificar ligandos de receptores GPR4 y G2A que tengan una estructura similar al OGR-1. Como resultado, se identificó que el GRP4 reconoce SPC y LPC como su ligando y el GPR4 promueve la proliferación celular por SPC y LPC, mientras que el OGR-1 suprime la proliferación celular por SPC (Zhu, K. et al., *J. Biol. Chem.*, 276(44): 41325-41335, 2001). Además, se publicó que G2A presenta una elevada afinidad por LPC, sin embargo, presenta una baja afinidad por SPC (Kabarowski, J. H. et al., *Science*, 293(5530): 702-705, 2001). G2A se encuentra fundamentalmente en linfocitos y su expresión está regulada al alza por estrés y señales mitogénicas prolongadas. Se publicó que en ratones knockout (con genes inactivados) que no tenían receptores G2A, se producen enfermedades autoinmunes (Le, L. Q. et al., *Immunity*, 14(5): 561-571, 2001).

Por lo tanto, durante la realización de estudios continuos para descubrir nuevos agentes terapéuticos para tratar enfermedades inflamatorias, los presentes inventores identificaron que los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A que existen en los neutrófilos bloquean la supresión de la apoptosis de neutrófilos por mediadores de inflamación y liberan IL-8 (interleucina-8) en neutrófilos y monocitos, y exhiben un excelente efecto terapéutico sobre una enfermedad inflamatoria, especialmente enfermedades inflamatorias asociadas con la hiperactividad de neutrófilos y la liberación excesiva de IL-8, o una enfermedad asociada a infección microbiana, y por tanto han completado la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para inducir la apoptosis de neutrófilos en células, tejidos o un organismo según las reivindicaciones usando un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones.

Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición para inhibir la liberación excesiva de IL-8 en células, tejidos o un organismo según las reivindicaciones usando un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones.

5 Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar una composición para aumentar la actividad bactericida de neutrófilos según las reivindicaciones usando un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones.

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar una composición para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la supresión de la apoptosis de neutrófilos o a la liberación excesiva de IL-8 según las reivindicaciones usando un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones.

10 Adicionalmente, otro objetivo de la invención es proporcionar una composición farmacéutica o terapéutica que comprende un ligando agonista específico para el receptor G2A como ingrediente activo para uso según las reivindicaciones.

Otro objetivo adicional de la invención es proporcionar un nuevo uso terapéutico de un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones.

15 Para alcanzar los objetivos anteriores, la presente invención proporciona el uso para inducir la apoptosis de neutrófilos en células, tejidos o un organismo según las reivindicaciones, que comprende la administración de un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones al interior de las células, tejidos u organismo en una cantidad efectiva para inducir la apoptosis de neutrófilos.

20 Para alcanzar otro objetivo de la invención, la invención proporciona el uso para inhibir la liberación de IL-8 en células, tejidos o un organismo según las reivindicaciones, que comprende administrar un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones al interior de las células, tejidos u organismo en una cantidad efectiva para inhibir la liberación de IL-8.

25 Para alcanzar otro objetivo de la invención, la invención proporciona el uso para aumentar la actividad bactericida de neutrófilos en células, tejidos o un organismo según las reivindicaciones, que comprende la administración de un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones al interior de las células, tejidos u organismo en una cantidad efectiva para aumentar la actividad bactericida de neutrófilos.

30 Para alcanzar otro objetivo de la invención, la invención proporciona el uso para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno según las reivindicaciones asociado a la supresión de la apoptosis de neutrófilos o a la liberación excesiva de IL-8 en un sujeto, que comprende la administración de un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones al sujeto.

Para alcanzar otro objetivo de la invención, la invención proporciona una composición farmacéutica para inducir la apoptosis de neutrófilos o para inhibir la liberación de IL-8 según las reivindicaciones que comprende un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones como un ingrediente activo.

35 Para alcanzar otro objetivo de la invención, la invención proporciona una composición para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado a la supresión de la apoptosis de neutrófilos o a la liberación excesiva de IL-8 según las reivindicaciones que comprende un ligando agonista específico para el receptor G2A según las reivindicaciones como un ingrediente activo.

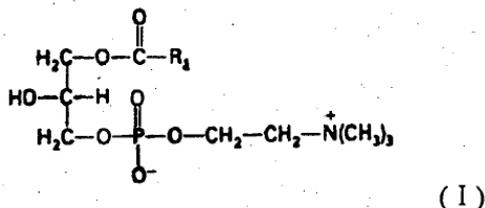
40 Además, para alcanzar otro objetivo de la invención, la invención proporciona un uso de un ligando agonista específica de receptor G2A según las reivindicaciones para la fabricación de una composición farmacéutica para inducir la apoptosis de neutrófilos o para inhibir la liberación de IL-8 según las reivindicaciones en células, tejidos o un organismo.

Para alcanzar otro objetivo de la invención, la invención proporciona un uso de un ligando agonista específico de receptor G2A según las reivindicaciones para la fabricación de un agente para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la supresión de la apoptosis de neutrófilos o a la liberación excesiva de IL-8 según las reivindicaciones.

45 La presente invención se describirá detalladamente.

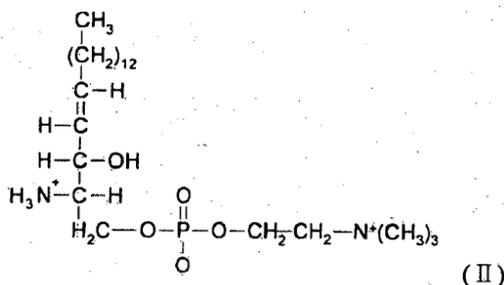
Los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según la presente invención incluyen LPC (lisofosfatidilcolina). Solo las LPCs, tal como son reivindicadas, forman parte de la invención.

La LPC se representa median la siguiente fórmula I:



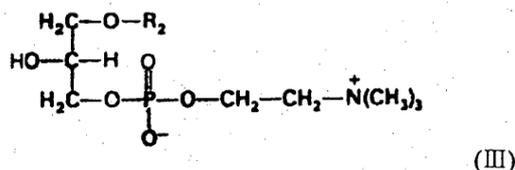
5 donde R_1 es un alquilo de C_{4-30} o un alquenoilo de C_{4-30} que tiene uno o más dobles enlaces. Preferiblemente, la LPC se selecciona del grupo que consiste en 1-estearoil (18:0) lisofosfatidilcolina ($\text{L}-\alpha$ -Lisofosfatidilcolina estearoil; Lisolecitina estearoil), 1-oleoil (18:1) lisofosfatidilcolina ($\text{L}-\alpha$ -Lisofosfatidilcolina oleoil; Lisolecitina oleoil), 1-miristoil (14:0) lisofosfatidilcolina ($\text{L}-\alpha$ -Lisofosfatidilcolina miristoil), 1-palmitoil (16:0) lisofosfatidilcolina ($\text{L}-\alpha$ -Lisofosfatidilcolina palmitoil; Lisolecitina palmitoil; $\text{DL}-\alpha$ -Lisofosfatidilcolina palmitoil).

Asimismo, la SPC descrita en la presente memoria se representa median la siguiente fórmula II:



10 En la SPC de la anterior fórmula II, el número de carbonos terminales de la porción de esfingosina puede variar entre 4 y 30.

Además, en la presente invención, se describen derivados de LPC o SPC: pueden ser derivados de éter de LPC representados por la siguiente fórmula III:



15 donde R_2 es un alquilo de C_{4-30} o un alquenoilo de C_{4-30} que tiene uno o más dobles enlaces, y puede seleccionarse del grupo que consiste en $\text{L}-\alpha$ -lisofosfatidilcolina- γ -O-alqu-1-enilo (Lisofosfatidilcolina), $\text{L}-\alpha$ -lisofosfatidilcolina- γ -O-alquilo (Liso-factor de activación de plaquetas), $\text{DL}-\alpha$ -lisofosfatidilcolina- γ -O-hexadecilo (rac-Liso-factor de activación de plaquetas), y $\text{L}-\alpha$ -lisofosfatidilcolina- γ -O-hexadecilo (Liso-factor de activación de plaquetas; Liso-PAF-C₁₆).

20 La LPC, la SPC y sus derivados se encuentran disponibles comercialmente con facilidad. Específicamente, se pueden adquirir en Sigma Chemical Co. (EE.UU.). Además, pueden aislarse a partir de animales y también se pueden preparar según métodos sintéticos bien conocidos en la técnica pertinente. La LPC, la SPC y sus derivados son sustancias endógenas en mamíferos, y por tanto su seguridad está bien probada.

25 Los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según la presente invención muestran principalmente dos actividades. En primer lugar, no muestran efecto antibacteriano *in vitro* directo pero tienen funciones *in vivo* de bloqueo tanto de la apoptosis de neutrófilos como de la liberación de IL-8 en neutrófilos y monocitos. Por lo tanto, pueden usarse de forma efectiva en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado a la supresión de la apoptosis de neutrófilos y/o la liberación excesiva de IL-8.

30 En segundo lugar, los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según la presente invención permiten a los neutrófilos matar patógenos más fácilmente aumentando su capacidad bactericida. A este respecto, se puede decir que los ligandos agonistas según la invención son un nuevo tipo de agente antibacteriano porque, aunque no muestran efectos asesinos directos contra patógenos, permiten que los neutrófilos eliminen patógenos más fácilmente. Por lo tanto, los ligandos agonistas según la invención se pueden usar como agente terapéutico o aditivo terapéutico para varias enfermedades asociadas a la infección microbiana.

La composición farmacéutica, o la composición terapéutica o preventiva que comprende un ligando agonista específico para el receptor G2A según la invención puede comprender además vehículos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, vehículos para administración oral o para administración parenteral. Los vehículos para administración oral pueden incluir lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros similares. Para administración oral, los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según la invención pueden usarse en la forma de comprimidos para ingerir, comprimidos bucales, sobres, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, tortas, etc. en una mezcla de excipientes. Asimismo, los vehículos para administración parenteral pueden comprender agua, aceites adecuados, disoluciones salinas, glucosa y glicoles solubles en agua, etc., y además pueden comprender un estabilizante o conservante. Como estabilizante adecuado, existen antioxidantes tales como el ácido ascórbico, sulfito sódico o hidrógeno sulfito sódico. Como conservante adecuado, están cloruro de benzalconio, metil- o propil-parabeno y clorobutanol. Para otros vehículos farmacéuticamente aceptables, se puede consultar la siguiente bibliografía: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª edición, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995.

La composición farmacéutica o la composición terapéutica según la presente invención pueden formularse en diversas formas de dosis parenterales u orales. La forma de dosis típica para administración parenteral es una forma de dosis para inyección, preferiblemente, una disolución o una suspensión acuosa isotónica. La forma de dosis para inyección pueden prepararse usando un agente de dispersión adecuado, un agente humectante adecuado o un agente de suspensión adecuado según lo métodos conocidos en la técnica pertinente. Por ejemplo, se disuelven todos los ingredientes en salino o tampón, y después se pueden formular en una forma de dosis para inyección. Asimismo, la forma dosis típica para administración oral son los comprimidos, las cápsulas, etc., que pueden comprender diluyentes (p.ej., lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina), o lubricantes (p.ej., sílice, talco, ácido esteárico y una sal de magnesio o calcio del mismo, y/o polietilen glicol) además del ingrediente activo. Adicionalmente, los comprimidos también pueden comprender aglomerantes tales como silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona. Si es necesario, pueden comprender además mezclas desintegrantes o efervescentes tales como almidón, agar, ácido algínico o la sal sódica del mismo, y/o absorbentes, colorantes, aromatizantes y edulcorantes. Dicha forma de dosis puede prepararse empleando métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento.

La composición farmacéutica o la composición terapéutica de la presente invención pueden comprender aditivos tales como antisépticos, hidratos o aceleradores de emulsión, sales para la regulación de la presión osmótica y/o sustancias auxiliares tales como tampones, y otras sustancias terapéuticamente útiles. Se pueden preparar como formulaciones según métodos convencionales.

Los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A como ingrediente activo de la composición farmacéutica o la composición terapéutica de la presente invención se pueden administrar a mamíferos que incluyen humanos por vía parenteral o por ruta oral en una cantidad de 0,01 a 100 mg/kg (de peso corporal) una vez o varias veces al día. La extensión de la cantidad administrada puede variar de forma adecuada con la edad, el peso corporal, la condición de salud, el sexo, el grado de enfermedad, la dieta, la hora de administración, la velocidad de excreción, la ruta de administración y otros similares. La composición farmacéutica o la composición terapéutica de la invención no está restringida a una dosis especial, una ruta de administración y un método de administración, siempre que retenga los efectos de la invención. Además, los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según la presente invención pueden co-administrarse junto a antibióticos o agentes terapéuticos para inflamación que se usen generalmente en enfermedades de inflamación cuando se aplican en enfermedades inflamatorias, y se co-administran junto a diversos agentes antibacterianos que comprenden los antibióticos previos cuando se aplican para tratar una enfermedad asociada a una infección microbiana.

Los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según la presente invención pueden usarse de manera efectiva para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociada a la acumulación de neutrófilos debido a la supresión de la apoptosis y a la hiperactividad y/o la liberación excesiva de IL-8 según las presentes reivindicaciones, especialmente enfermedades inflamatorias. Las enfermedades inflamatorias a las cuales se pueden aplicar los ligandos agonistas según la presente invención incluyen todas las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas asociadas a la supresión de la apoptosis de neutrófilos y la hiperactividad de neutrófilos y/o la liberación excesiva de IL-8, y las complicaciones de las mismas. "Inflamación crónica" se refiere a todas las enfermedades que inducen lesiones tisulares o que inducen la inflamación continua debido a una acumulación de neutrófilos excesiva y la hiperactividad y la liberación excesiva de IL-8, y las complicaciones de las mismas. En particular, las enfermedades inflamatorias a las cuales se pueden aplicar los ligandos agonistas de la invención incluyen la enfermedad inflamatoria del intestino tal como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, peritonitis, osteomielitis, celulitis, meningitis, cerebritis, pancreatitis, choque inducido por trauma, asma bronquial, rinitis alérgica, fibrosis quística, apoplejía cerebral, bronquitis aguda, bronquitis crónica, bronquiolitis aguda, bronquiolitis crónica, osteoartritis, gota, artropatía espinal, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artropatía sorriática, espondilitis enteropática, artropatía juvenil, espondilitis anquilosante juvenil, artropatía reactiva, artritis infecciosa, artritis post-infecciosa, artritis gonococal, artritis tuberculosa, artritis vírica, artritis fúngica, artritis sifilítica, enfermedad de Lyme, artritis asociada a "síndrome de vasculitis", poliarteritis nodosa, vasculitis de hipersensibilidad, granulomatosis de Wegener, polimialgia reumática, arteritis de célula gigante, artropatía de deposición de cristales de calcio, pseudogota, reumatismo no articular, bursitis, tenosinovitis, epicondilitis (codo de tenista), enfermedad

5 articular neuropática (articulación de Charcot), hemarrágico, púrpura de Henoch-Schonlein, osteoartropatía hipertrófica, reticulohistiocitoma multicéntrico, escoliosis, hemocromatosis, meniscocitosis, otras hemoglobinopatía, hiperlipoproteinemia, hipogammaglobulinemia, fiebre mediterránea familiar, enfermedad de Gerhardt, lupus sistémico eritematoso, fiebre recurrente, soriasis, esclerosis múltiple, sepsis (septicemia), choque séptico, síndrome de dificultad respiratoria aguda, síndrome de disfunción multiorgánica, enfermedad obstructiva pulmonar crónica, artritis reumática, lesión pulmonar aguda, displasia broncopulmonar, y otras similares. Solo el tratamiento de la sepsis y del choque séptico forma parte de la invención.

10 Adicionalmente, se ha publicado que en pacientes con lesión de isquemia-reperusión, se produce una acumulación excesiva de neutrófilos. Es decir, casi todos los órganos y tejidos que incluyen el corazón, el cerebro, los riñones, el hígado, etc., sufren daños tisulares debidos a la reperusión cuando se produce el trastorno de la corriente sanguínea. Se ha sabido que los neutrófilos desempeñan un papel importante en este proceso (Jordan et al., *Cardiovasc. Res.*, 43, 860-78, 1999). Por consiguiente, los ligandos agonistas según la presente invención se pueden aplicar para tratar la lesión de isquemia-reperusión que incluye la enfermedad cerebral isquémica, la enfermedad cardíaca isquémica, la enfermedad renal isquémica, la enfermedad hepática isquémica, la enfermedad intestinal isquémica, la lesión en órganos debida al trastorno de la corriente sanguínea en trasplantes, etc., así como enfermedades inflamatorias.

15 Además, la presente invención proporciona un uso terapéutico de los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A. Específicamente, la presente invención proporciona un uso de los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según las reivindicaciones para la fabricación de una composición farmacéutica para recuperar la apoptosis de neutrófilos suprimida, inhibir la liberación de IL-8, o aumentar la actividad bactericida de los neutrófilos, en células, tejidos o un organismo según las reivindicaciones. La composición farmacéutica puede comprender además vehículos farmacéuticamente aceptables además de LPC (fórmula I), tal como se reivindica. Los ejemplos de los vehículos farmacéuticamente aceptables son los enumerados anteriormente. La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar oral o parenteralmente, y los ejemplos de administración oral o parenteral son los mencionados anteriormente. Asimismo, la presente invención proporciona un uso de los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según las reivindicaciones para la fabricación de un agente para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la supresión de la apoptosis de neutrófilos y a la hiperactividad de neutrófilos y/o a la excesiva liberación de IL-8 según las reivindicaciones. Los ejemplos de enfermedades o trastornos a los cuales se pueden aplicar los ligandos agonistas según la presente invención son los enumerados anteriormente.

30 Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra los efectos inhibidores de 1-estearoil LPC contra la supresión de la apoptosis de neutrófilos que es inducida por un mediador de inflamación exógena (LPS; A) o por mediadores de inflamación endógenos (GM-CSF, G-CSF e IFN- γ ; B).

35 **Figura 2:** muestra los efectos inhibidores de 1-estearoil LPC frente a la liberación excesiva de IL-8 que es inducida por LPS en neutrófilos (A) y monocitos (B).

Figura 3: muestra los resultados RT-PCR obtenidos usando ARN aislado de neutrófilos como plantilla y cebadores específicos para el receptores G2A ó GPR4.

RT (+): RT-PCR se lleva a cabo con transcriptasa inversa.

RT (-): RT-PCR se lleva a cabo sin transcriptasa inversa (Grupo de control).

40 **Figura 4:** muestra los efectos inhibidores de SPC contra la supresión de apoptosis de neutrófilos que es inducida por LPS. (No forma parte de la invención).

Figura 5: muestra los efectos de 1-estearoil LPC en un modelo de septicemia inducido por *E. coli*.

A: Tasa de supervivencia de ratones con el transcurso del tiempo tras la administración de LPC.

B: Número de células de *E. coli* intraperitoneales en los ratones 24 horas después de que se administre la LPC.

45 **Figura 6:** muestra los efectos de 1-estearoil LPC en un modelo de septicemia inducida por CLP.

A: Número de células de *E. coli* intraperitoneales en los ratones cuando la LPC se administra 2 horas y 14 horas después de la cirugía CLP, respectivamente.

B: Tasas de supervivencia de ratones con el transcurso del tiempo cuando se administra LPC cuatro veces en intervalos de 12 horas, 2 horas después de la cirugía CLP.

50 C: Tasas de supervivencia de ratones con el transcurso del tiempo cuando se administra la LPC cuatro veces a intervalos de 12 horas, 10 horas tras la cirugía CLP.

Figura 7: muestra los efectos de 1-miristoil LPC (14:0 LPC) y 1-oleoil LPC (18:1 LPC) en un modelo de septicemia inducido por CLP.

Figura 8: muestra los efectos de SPC en un modelo de septicemia inducido por CLP. (No forma parte de la invención).

5 **Figura 9:** muestra los efectos de 1-estearoil LPC frente al síndrome de dificultad respiratoria aguda en un modelo local de lesión pulmonar aguda inducida por LPS (A), un modelo sistémico de lesión pulmonar aguda inducida por LPS (B), y un modelo de lesión pulmonar aguda por sepsis inducida por CLP (C).

Figura 10: muestra los efectos de 1-estearoil LPC frente al síndrome de disfunción multiorgánica en un modelo de sepsis inducida por CLP.

10 **Figura 11:** muestra los efectos de 1-estearoil LPC en relación a la actividad bactericida de neutrófilos en un modelo de sepsis inducido por bacterias.

Modo óptimo de realización de la invención

La presente invención se describirá más detalladamente en virtud a los siguientes ejemplos.

15 Sin embargo, los ejemplos mostrados a continuación se proporcionan únicamente para ilustrar la invención. En los siguientes ejemplos, los porcentajes relativo a mezclas sólido/sólido, líquido/líquido y líquido/sólido están expresados como peso/peso, volumen/volumen y peso/volumen, respectivamente, y a menos que se indique lo contrario todas las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente.

EJEMPLO 1

Efectos inhibidores de LPC frente a la anti-apoptosis de neutrófilos por mediadores de inflamación

20 <1-1> Aislamiento de neutrófilos

Los neutrófilos fueron aislados de adultos sanos usando un gradiente Percoll discontinuo según el método de Szucs, S. et al. (*J. Immunol. Methods*, 167: 245-251, 1994). En primer lugar, se separaron los plasmas de sangre entera heparinizada, y se agotaron las células rojas por sedimentación con dextrano. Después de eso, los leucocitos fueron distribuidos sobre un gradiente Percoll con densidades de 1,077 y 1,094 (Pharmacia, Suecia). Se recuperaron capas de neutrófilos separadas de la interfaz del gradiente Percoll, y a continuación se lavaron con HBSS (disolución salina equilibrada de Hank, Sigma Chemical Co., EE.UU.). La partícula restante fue resuspendida en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de FBS (suero bovino fetal) y gentamicina 2 mM. Como resultado del examen del citospin teñido con Wright-Giemsa (Sigma Chemical Co., EE.UU.), se observó que la disolución de resuspensión contenía un 95% o más de neutrófilos. Asimismo, como resultado del examen usando el método de exclusión de colorante de azul de tripano, se observaron el 98% o más de neutrófilos.

<1-2> Efectos inhibidores de la LPC frente a la anti-apoptosis de neutrófilos por mediador de la inflamación exógeno

Se cultivaron 1×10^5 células de neutrófilos aisladas en el anterior Ejemplo <1-1> en una placa de 96 pocillos a la cual se añadió medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS. Después de eso, se trataron con 1-estearoil lisofosfatidilcolina (Sigma Chemical Co., EE.UU.) en concentraciones de 15 μ M y 30 μ M, respectivamente. Tras 1 hora, fueron tratadas con 1 μ g/mL de LPS (Sigma Chemical Co.). Tras 24 horas, se eliminó el medio de las placas y las células restantes fueron lavadas dos veces con tampón PBS (salino tamponado con fosfato) a 4°C. Las células adheridas al fondo de la placa fueron rascadas y llevadas a un tubo eppendorf de 1,5 mL. A continuación fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, y se retiró el sobrenadante. Nuevamente, se añadió 0,1 mL de tampón PBS a 4°C a la partícula, que entonces se mezcló bien pipeteando. A 25 μ L de la suspensión celular se añadieron 2 μ L de disolución colorante AcOr/EtBr en la cual se mezclaron 100 μ g/mL de naranja de acridina (AcOr) y 100 μ g/mL de bromuro de etidio (EtBr). A continuación, se calculó el porcentaje de células apoptóticas/células totales observando las células de neutrófilos bajo un microscopio de fluorescencia. Como resultado, tal como se muestra en la Figura 1A, el porcentaje de apoptosis de neutrófilos que había bajado por LPS se vio aumentado por 1-estearoil LPC de un modo dependiente de la concentración. Por consiguiente, se puede observar que la LPC bloquea de manera efectiva el efecto del mediador de la inflamación exógeno que inhibe la apoptosis de neutrófilos.

<1-3> Efectos inhibidores de LPC frente a la anti-apoptosis de neutrófilos por mediadores de la inflamación endógenos

Los experimentos fueron llevados a cabo según los mismos métodos usados en el Ejemplo <1-2>, excepto en que los neutrófilos aislados en el Ejemplo <1-1> fueron tratados con 100 ng/mL de GM-CSF (Sigma Chemical Co.), 100 ng/mL de G-CSF (Sigma Chemical Co.) y 100 ng/mL de IFN- γ (Sigma Chemical Co.), respectivamente, en lugar de LPS. Como resultado, como se muestra en la Figura 1B, el porcentaje de apoptosis de neutrófilos que había disminuido por acción de mediadores de la inflamación endógenos se vio incrementado por 1-estearoil LPC de un modo dependiente de la concentración. Por consiguiente, se puede observar que la LPC bloquea de manera efectiva

los efectos inhibidores de la apoptosis de neutrófilos por acción de mediadores de la inflamación endógenos, así como por acción de mediadores de la inflamación exógenos.

EJEMPLO 2

Efectos inhibidores de LPC frente a la liberación de IL-8, que es una citosina inductora de inflamación

5 Se investigaron los efectos de la LPC con respecto a la liberación de IL-8, una citosina inductora de inflamación importante en los neutrófilos y los monocitos sanguíneos, que se considera seriamente como el mecanismo de inicio de las enfermedades inflamatorias.

<2-1> Aislamiento de neutrófilos

10 Los neutrófilos fueron aislados según el método de Szucs, S. et al. (*J. Immunol. Methods*, 167: 245-251, 1994) tal como se ha descrito antes en el Ejemplo <1-1>.

<2-2> Aislamiento de monocitos

15 Se tomaron muestras de sangre periférica de una persona sana, se colocaron en un tubo heparinizado y después se mezcló bien con 1x de tampón PBS. A continuación se distribuyó por capas en una disolución Ficoll-Hypaque (densidad 1,077, Sigma Chemical Co., EE.UU.) y después se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 25 minutos. Una vez que la capa de monocitos entre la capa de Ficoll y la capa de plasma había sido recuperada con cuidado, se añadió a la misma 1x de tampón PBS y se mezcló bien. Entonces se centrifugó nuevamente a 2500 rpm a 4°C durante 25 minutos. Dicho procedimiento de centrifugación se repitió dos veces hasta que se hubieron agotado las células sanguíneas rojas. Después de eso, la partícula se cultivó en FBS a 37°C durante 15 minutos y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. A continuación se añadió 1x de tampón PBS nuevamente a la partícula. Las células aisladas fueron distribuidas en capas en una disolución Percoll (densidad 1,066) y después se centrifugaron a 2500 rpm a 4°C durante 30 minutos. Tras haber recuperado solo la capa de monocitos de las capas aisladas, se añadió a la misma 1x de tampón PBS. Se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. Tras repetir la centrifugación dos o tres veces, los monocitos aislados fueron inoculados en medio RPMI1640 que contenía un 10% de FBS y se cultivó en un incubador con un 5% de CO₂ a 37°C.

25 <2-3> Medida de IL-8

30 Los neutrófilos y los monocitos aislados en los Ejemplos <2-1> y <2-2> anteriores fueron cultivados en una placa de 96 pocillos a la cual se añadió medio RPMI1640 que contenía un 10% de FBS, a una concentración de 1×10^5 células/pocillo/0,2 mL, respectivamente. Fueron tratados con 1-estearoil LPC en concentraciones de 15 μ M y 30 μ M, respectivamente. Tras 1 hora, fueron tratados con 1 μ g/mL de LPS. Tras 3 horas, los sobrenadantes fueron recolectados y llevados a un tubo eppendorf. A continuación, se midió el nivel de IL-8 usando un kit ELISA (Biosource, EE.UU.). Como resultado, tal como se muestra en la Figura 2, el nivel de liberación de IL-8 que había aumentado por LPS en los neutrófilos (A; PMNs humanas) y en los monocitos (B; PBMC humana) se vio inhibido por la LPC de un modo dependiente de la concentración.

EJEMPLO 3

35 Búsqueda de receptores específicos de LPC que existan en los neutrófilos

40 A día de hoy, se sabe que el G2A y el GPR4 son receptores a los cuales se une específicamente la LPC (Zhu, K. et al., *J. Biol. Chem.*, 276(44): 41325-41335, 2001; Kabarowski, J. H. et al., *Science*, 293(5530): 702-705, 2001). Especialmente, el hecho de que el G2A existe en los monocitos como receptor de LPC fue publicado por Rikitake et al. (Rikitake et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22: 2049-53, 2002). Sin embargo, para los neutrófilos no se conoce nada. Por consiguiente, los presentes inventores han investigado si existen receptores específicos de LPC en los neutrófilos.

45 En primer lugar, se aislaron los neutrófilos de muestras de sangre según los mismos métodos descritos anteriormente en el Ejemplo <1-1>. A continuación se aisló el ARN de los neutrófilos aislados usando el reactivo TRIZOL (GibcoBRL, EE.UU.). Se llevó a cabo una RT-PCR usando cebadores específicos de G2A (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) y cebadores específicos de GPR4 (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4), respectivamente. Los tamaños de G2A y GPR4 a amplificar por cada cebador fueron de 409 pb y 247 pb, respectivamente. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 40 ciclos de 94°C/2 min, 60°C/1,5 min y 72°C/2 min. Como control, se llevó a cabo una RT-PCR sin transcriptasa inversa (RT). Como resultado, tal como se muestra en la Figura 3, el nivel de expresión de G2A se vio marcadamente incrementado en comparación con el grupo de control. Por otro lado, el nivel de expresión de cada receptor observado en el grupo de control se considera debido al hecho de que el ADN no fue eliminado por completo durante el proceso de aislamiento de ARN. A partir de los resultados de estos experimentos, se considera que la LPC tiene una función inhibidora de anti-apoptosis e inhibe la liberación de IL-8 actuando sobre el receptor G2A.

<EJEMPLO 4> (referencia)**Efectos inhibidores de SPC frente a anti-apoptosis de neutrófilos por mediadores de la inflamación**

5 Con el objetivo de examinar si la SPC, conocida por ser otro ligando agonista de receptor G2A, tiene las mismas funciones que la LPC, se llevaron a cabo experimentos según los mismos métodos usados anteriormente en el Ejemplo <1-2>, excepto que en lugar de LPC se usó SPC (Sigma-Aldrich Co.). Los resultados se muestran en la Figura 4. Tal como se muestra en la Figura 4, el porcentaje de apoptosis de neutrófilos que había disminuido por LPS se vio incrementado por la SPC de un modo dependiente de la concentración. Por consiguiente, se puede observar que la SPC, otro ligando específico para el receptor G2A, tiene las mismas funciones que la LPC.

<Ejemplo de referencia 1>**10 Preparación del modelo de septicemia**

<1-1> Modelo de sepsis inducido directamente: modelo de sepsis inducido por bacterias y modelo de sepsis inducido por LPS

a) Modelo de sepsis inducido por bacterias

15 Se inyectó a ratones ICR (25-30 g de peso corporal; MJ Ltd.) intraperitonealmente con 10^8 células vivas/mL de *E. coli* (DH5a) que fueron suspendidas en 0,5 mL de PBS (salino tamponado con fosfato) para provocar peritonitis, induciendo con ello la sepsis.

b) Modelo de sepsis inducida por LPS

Se inyectó a ratones ICR (25-30 g de peso corporal; MJ Ltd.) intraperitonealmente con LPS (inducida a partir de *E. coli* 055:B5) en una cantidad de 1 mg/kg, induciendo con ello la sepsis.

20 <1-2> Modelo de sepsis inducida indirectamente: modelo de sepsis inducida por CLP

Tras anestesiarse a ratones ICR (25-30 g de peso corporal; MJ Ltd.) con pentobarbital, se diseccionaron las zonas abdominales del costado derecho con una longitud de 1 cm para exponer su ciego, y se ligaron los sitios por debajo de la válvula ileocecal. Después, tras haber creado 4-6 perforaciones sobre el ciego con una aguja del 21, se suturó el abdomen nuevamente para provocar peritonitis, induciendo de este modo la sepsis.

25 <Ejemplo de referencia 2>**Determinación de la actividad de mieloperoxidasa en tejidos pulmonares**

30 Se determinó la actividad de mieloperoxidasa (MPO), un indicador de neutrófilos, en tejidos pulmonares según los métodos de Goldblum et al (*J. Appl. Physiol.* 59: 1978, 1985) y Parey et al (*J. Immunol.* 160: 1007, 1998). Primeramente, se sacrificaron ratones y se obtuvieron los mismos tejidos pulmonares. Los tejidos habían sido homogeneizados en tampón de fosfato potásico, y se centrifugaron para obtener partículas. Dichas partículas fueron sometidas a ultrasonidos en tampón de fosfato potásico que contenía un 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB), y se incubaron a 60°C durante 120 minutos. Tras centrifugación se obtuvieron los sobrenadantes. Se mezclaron 0,02 mL de sobrenadantes con una disolución de tampón de fosfato potásico (0,18 mL) que contenía dihidrocloruro de o-dianisidina de 0,167 mg/mL y un 0,0005% de peróxido de hidrógeno. A continuación se determinó la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 460 nm.

<Ejemplo de referencia 3>**Determinación del número de *E. coli* intraperitoneales**

40 Después de que la cavidad peritoneal hubiera sido expuesta, se lavó con salino esterilizado (2 mL). La disolución resultante se diluyó con HBSS (Sigma Chemical Co., EE.UU.) en una proporción de 1/1000, y a continuación se dispersaron 10 µL de cada disolución diluida sobre placas de agar Trypticase Soy (BBL, Becton Dickinson Co., EE.UU.). Tras incubación durante una noche a 37°C, se midieron las unidades de formación de colonias (CFU).

<EJEMPLO 5>**Efectos terapéuticos de 1-estearoil LPC en el modelo de sepsis inducida por bacterias**

45 14 ratones ICR del modelo de septicemia inducida por bacterias según el Ejemplo de referencia <1-1> a) fueron divididos en dos grupos de 7 ratones. Se administró a 7 ratones 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co., EE.UU.) disuelto en una disolución al 1% de BSA (albúmina de suero bovino) que no contenía ácidos grasos en una cantidad de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea, 2 y 14 horas después de que se inyectara intraperitonealmente *E. coli*, respectivamente (grupo experimental). A los restantes 7 ratones se les administró una disolución al 1% de BSA que no contenía ácidos grasos en la misma cantidad indicada anteriormente, en lugar de LPC, del mismo modo (grupo

de control). En consecuencia, se examinaron las tasas de supervivencia de los ratones de los grupos experimental y de control a lo largo del tiempo. Asimismo, se midió el número de células de *E. coli* intraperitoneales 24 horas después de la inyección intraperitoneal según el método descrito en el Ejemplo de Referencia 3. Se calcularon los valores medios y se representan en la Figura 5. Tal como se muestra en las Figuras 5A y 5B, en los ratones del grupo experimental en el que se había administrado LPC, la tasa de mortalidad debida a septicemia fue suprimida de manera significativa ($p < 0,05$) y el número de células de *E. coli* intraperitoneales también disminuyó pronunciadamente ($p < 0,01$).

<EJEMPLO 6>

Efectos terapéuticos de 1-estearoil LPC en el modelo de sepsis inducida por CLP

<6-1> En el caso en que se administra LPC 2 y 10 horas después de cirugía CLP, respectivamente

14 ratones ICR del modelo de septicemia inducida por CLP según el Ejemplo de referencia <1-2> fueron divididos en dos grupos de 7 ratones. Se administró a 7 ratones 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co., EE.UU.) disuelto en una disolución al 1% de BSA (albúmina de suero bovino) que no contenía ácidos grasos en una cantidad de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea, 2 y 14 horas después de la cirugía CLP, respectivamente (grupo experimental). A los restantes 7 ratones se les administró una disolución al 1% de BSA que no contenía ácidos grasos en la misma cantidad indicada anteriormente del mismo modo (grupo de control). Se midió el número de células de *E. coli* intraperitoneales en los ratones ICR de los grupos experimental y de control según el método descrito en el Ejemplo de Referencia 3, 24 horas después de la cirugía CLP. Se calcularon los valores medios y se representan en la Figura 6A. Tal como se muestra en la Figura 6A, se puede observar que en los ratones del grupo experimental, a los que se había administrado LPC, el número de células de *E. coli* intraperitoneales disminuyó pronunciadamente ($p < 0,01$).

<6-2> En el caso en que se administra LPC cuatro veces a intervalos de 12 horas, 2 horas después de cirugía CLP

40 ratones ICR del modelo de septicemia inducida por CLP según el Ejemplo de referencia <1-2> fueron divididos en cuatro grupos de 10 ratones. A cada grupo de 10 ratones ICR se les administró intraperitonealmente 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co., EE.UU.) disuelto en una disolución de BSA al 1% que no contenía ácidos grasos en cantidades de 5, 10 y 20 mg/kg, respectivamente, cuatro veces a intervalos de 12 horas, 2 horas después de la cirugía CLP (grupo experimental 1, 2 y 3). A los restantes 10 ratones ICR se les administró solo disolución de BSA al 1% que no contenía ácidos grasos (grupo de control). A continuación, se investigaron las tasas de supervivencia con el tiempo de los ratones de los grupos experimentales y de control. Los resultados se muestran en la Figura 6B, la tasa de supervivencia de los ratones de los grupos experimentales en los que se administró LPC fue muy superior a la de los ratones del grupo de control.

<6-3> En el caso en que se administra LPC cuatro veces a intervalos de 12 horas, 10 horas después de cirugía CLP

A fin de investigar si la LPC tiene o no un efecto terapéutico incluso en los casos en los que la septicemia ya se había desarrollado, se dividieron en dos grupos 20 ratones ICR del modelo de sepsis inducida por CLP según el Ejemplo de referencia <1-2>. A 10 ratones del grupo experimental se les administró intraperitonealmente 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co. EE.UU.) disuelta en una disolución de BSA al 1% que no contenía ácidos grasos en una cantidad de 10 mg/kg, cuatro veces a intervalos de 12 horas, 10 horas después de la cirugía CLP. A los restantes 10 ratones del grupo de control se les administró solo la disolución de BSA al 1% que no contenía ácidos grasos. Después de eso, se investigaron las tasas de supervivencia con el tiempo de los ratones ICR de los grupos experimental y de control. Los resultados se muestran en la Figura 6C. Tal como se muestra en la Figura 6C, incluso cuando se la septicemia se había desarrollado más, la LPC demostró un excelente efecto terapéutico.

<EJEMPLO 7>

Efectos terapéuticos de 1-oleoil LPC y 1-miristoil LPC en el modelo de sepsis inducida por CLP

Con el objetivo de investigar si las LPCs con otros sustituyentes (R_1) diferentes al 1-estearoil tienen un efecto sobre la septicemia, se administró intraperitonealmente LPCs con 1-oleoil y 1-miristoil en una cantidad de 10 mg/kg según los mismos métodos usados en el Ejemplo <6-2>. Como resultado, tal como se muestra en la Figura 7, tanto la 1-oleoil LPC como la 1-miristoil LPC demostraron un excelente efector terapéutico contra la sepsis.

<Ejemplo comparativo>

Actividad antibacteriana *in vitro* de LPC

Se añadió 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co., EE.UU.) a medio LB en concentraciones de 12, 60 y 300 mM, respectivamente, que fueron vertidas en placas Petri y endurecidas (grupo experimental 1, 2 y 3). Se usaron cuatro placas Petri por grupo. Para el grupo de control, solo se vertió medio LB en cuatro placas Petri de 60 mm y se endureció. Se lavó la cavidad peritoneal de los ratones según el Ejemplo <6-1> con salino esterilizado. La disolución resultante se diluyó con HBSS en una proporción de 1/100, y a continuación se extendieron 10 μ L de la disolución

diluida sobre el medio para cada grupo. Posteriormente, después de haber sido incubados, en incubadora de bacterias mantenida a 37°C durante 12 horas, se midieron visualmente las unidades formadoras de colonias (CFU).

[Tabla 1]

Actividad antibacteriana *in vitro* de LPC

	Grupo de control	Grupo experim. 1	Grupo experim. 2	Grupo experim. 3
Conc. de LPC	0 μ M	12 μ M	60 μ M	300 μ M
CFU	498 \pm 189	661 \pm 285	639 \pm 304	611 \pm 281

5

Tal como se muestra en la Tabla 1 anterior, no se observaron efectos antibacterianos *in vitro* directos de la LPC contra *E. coli*.

<EJEMPLO 8> (Referencia)

Efectos de SPC en el modelo de sepsis inducida por CLP

10 Los ratones del modelo de sepsis inducida por CLP fueron inyectados subcutáneamente con SPC, en lugar de 1-estearoil LPC, en dosis de 3 mg/kg y 30 mg/kg cuatro veces a intervalos de 12 horas, 2 horas después de la cirugía CLP, respectivamente. Se investigaron las tasas de supervivencia de los ratones. Como resultado, tal como se muestra en la Figura 8, se pudo observar que como la LPC, la SPC inhibe de forma efectiva la tasa de mortalidad debida a sepsis de CLP con una dosis de 30 mg/kg.

15 **<EJEMPLO 9>**

Efectos terapéuticos de LPC contra el Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda

<9-1> Modelo de Lesión Pulmonar Aguda (LPA) inducida por LPS

Se administró intratraquealmente a los ratones LPS para provocar una lesión pulmonar aguda directa, induciendo de este modo el síndrome de dificultad respiratoria aguda.

20 Se dividieron 35 ratones ICR (25-30 g de peso corporal, MJ Ltd.) en cinco grupos de 7 ratones (grupo Sham, grupos experimentales 1, 2 y 3, y un grupo de control). Todos los ratones fueron anestesiados con pentobarbital, se diseccionó su piel con una longitud de 1 cm para exponer sus bronquios. A los ratones del grupo Sham se les administró intratraquealmente una disolución de PBS (50 μ L) y después fueron suturados, mientras que a los ratones ICR de los grupos experimentales y de control se les administró directamente intratraquealmente LPS (6 μ g/50 μ L de tampón PBS) y después fueron suturados. Posteriormente, a los ratones ICR de los grupos experimentales 1, 2 y 3 se les administró subcutáneamente 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co., EE.UU.) disuelto en una disolución de BSA al 1%, que no contenía ácidos grasos, en cantidades de 5, 10 y 20 mg/kg, respectivamente, 2 y 14 horas después de la administración de LPS. Por otro lado, a los ratones ICR del grupo de control se les administró disolución de BSA al 1%, que no contenía ácidos grasos, en la misma cantidad, en lugar de LPC, y del mismo modo. 24 horas después de la administración de LPS, se determinó la actividad de MPO, un indicador de neutrófilos, en los tejidos pulmonares de los ratones ICR de cada grupo, tal como se describe en el Ejemplo de referencia 2, y los valores medios se presentan en la Figura 9A. Tal como se muestra en la Figura 9A, cuando el LPS se administra intratraquealmente, la actividad de MPO se ve incrementada significativamente ($p < 0,001$). En los ratones ICR de los grupos experimentales, la actividad de MPO fue suprimida de un modo dependiente de la concentración, en comparación con los ratones del grupo de control. Cuando se administra la LPC a ratones ICR en una cantidad de 20 mg/kg (grupo experimental 3), se obtuvieron los efectos más excelentes ($p < 0,01$).

<9-2> Modelo de lesión pulmonar aguda inducida por LPC sistémica

40 La lesión pulmonar agua indirecta fue provocada mediante administración sistémica de LPS, mediante lo cual se indujo el síndrome de dificultad respiratoria aguda.

Se dividieron 35 ratones ICR del modelo de septicemia inducida por LPS según el Ejemplo de referencia <1-1> b) en cinco grupos de 7 ratones (grupo Sham, un grupo experimental 1, un grupo experimental 2, un grupo experimental 3 y un grupo de control). A los ratones del grupo Sham se les administró intraperitonealmente tampón PBS (0,5 mL/100 g de peso), en lugar de LPS. A los ratones de los grupos experimentales 1, 2 y 3 se les administró subcutáneamente 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co., EE.UU.) disuelto en una disolución de BSA al 1%, que no contenía ácidos grasos, en cantidades de 5, 10 y 20 mg/kg, respectivamente, 2 y 14 horas después de la administración de LPS. Por otro lado, a los ratones del grupo de control se les administró una disolución de BSA al 1%, que no contenía ácidos grasos, en la misma cantidad, en lugar de LPC, y del mismo modo. A las 24 horas de la administración del LPS, se determinó la actividad de MPO, un indicador de neutrófilos, en los tejidos pulmonares de

45

los ratones de cada grupo, tal como se describe en el Ejemplo de referencia 2. En la Figura 9B se muestran los valores medios. Tal como se muestra en la Figura 9B, cuando se administra el LPS intraperitonealmente, la actividad de MPO se ve incrementada significativamente ($p < 0,01$). En los ratones de los grupos experimentales, la actividad de MPO fue suprimida de un modo dependiente de la concentración, en comparación con los ratones del grupo de control. Cuando la LPC se administra a los ratones ICR en una cantidad de 20 mg/kg (grupo experimental 3), se obtienen los resultados más excelentes ($p < 0,01$).

<9-3> Modelo de Lesión Pulmonar Aguda por sepsis inducida por CLP

Se usó el modelo de sepsis inducida por CLP para provocar la lesión pulmonar aguda indirecta, induciendo de este modo el síndrome de dificultad respiratoria aguda.

Se dividieron 20 ratones ICR del modelo de sepsis inducida por CLP según el Ejemplo de referencia <1-2> en dos grupos. A 10 ratones del grupo experimental se les administró 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co., EE.UU.) disuelto en una disolución de BSA al 1%, que no contenía ácidos grasos, en una cantidad de 10 mg/kg mediante inyección subcutánea 2 y 14 horas después de la cirugía CLP, respectivamente. A los restantes 10 ratones del grupo de control se les administró únicamente la disolución de BSA al 1%, que no contenía ácidos grasos. Simultáneamente, se anestesiaron 10 ratones ICR (de 25-30 g de peso corporal, ML Ltd.) con pentobarbital, a los cuales se les diseccionó la zona abdominal con una longitud de 1 cm para exponer su ciego, y a continuación volvieron a ser suturados (grupo Sham). Justo después de la cirugía CLP y 4, 8 y 16 horas después, se determinó la actividad de MPO, un indicador de neutrófilos, en los tejidos pulmonares de los ratones de cada grupo, tal como se describe en el Ejemplo de referencia 2 y se muestra en la Figura 9C. Tal como se muestra en la Figura 9C, la actividad de MPO aumentó marcadamente desde 4 horas después de la cirugía CLP y se mantuvo hasta las 16 horas. En los ratones ICR del grupo experimental, la actividad de MPO, que había aumentado por la cirugía CLP, disminuyó marcadamente en comparación con el grupo de control.

<EJEMPLO 10>

Efectos terapéuticos de LPC frente al Síndrome de Disfunción Multiorgánica

La septicemia provoca el síndrome de disfunción multiorgánica como complicación derivada y habitualmente se ven afectados el pulmón, el hígado, los riñones, etc. Se investigó el efecto de la LPC frente a la lesión hepática como uno de los síndromes de disfunción multiorgánica. Se dividieron 20 ratones ICR del modelo de septicemia inducido por CLP según el Ejemplo de referencia <1-2> en dos grupos. A 10 ratones del grupo experimental se les administró 1-estearoil LPC (Sigma Chemical Co., EE.UU.) disuelto en una disolución de BSA al 1%, que no contenía ácidos grasos, en una cantidad de 10 mg/kg vía inyección subcutánea 2 y 14 horas después de la cirugía CLP, respectivamente. A los restantes 10 ratones del grupo de control se les administró solo la disolución de BSA al 1%, que no contenía ácidos grasos. Simultáneamente, se anestesiaron 10 ratones ICR (de 25-30 g de peso corporal; MJ Ltd.) con pentobarbital, a los que se diseccionó la zona abdominal con una longitud de 1 cm para exponer su ciego, y después fueron suturados de nuevo (grupo Sham). 16 horas después de la cirugía CLP, se tomaron muestras de sangre de ratones de cada grupo. Se determinó el nivel de alanina aminotransferasa (ALT), un indicador de hepatotoxicidad, según el método de Reitman-Frankel (Witter & Grubbs, *Clin. Chim. Acta*, 13: 524-7, 1966). Como resultado, tal como se muestra en la Figura 10, en los ratones ICR del grupo experimental, el nivel de ALT, que se había incrementado con la cirugía CLP, se vio claramente suprimido en comparación con el grupo de control.

<EJEMPLO 11>

Efectos de LPC sobre la actividad bactericida de neutrófilos en el modelo de sepsis inducida por bacterias

A fin de investigar el mecanismo de cómo disminuye pronunciadamente el número de células de *E. coli* intraperitoneales en los ratones debido a la administración de LPC del anterior Ejemplo 5, los inventores han llevado a cabo los siguientes experimentos: se tomaron muestras de sangre de ratones del modelo de septicemia inducido por bacterias preparado en el Ejemplo de referencia <1-1> a), y se aislaron neutrófilos a partir de las mismas. Los neutrófilos aislados fueron adheridos a un cubreobjetos recubierto con poli-L-Lisina (0,01%) en una incubadora de células mantenida a 37°C, con una concentración celular de 10^6 células/mL durante 1 hora. Después se añadió *E. coli* en una concentración de 10^6 células/mL y se cultivó durante 1 hora. Las células de *E. coli* no ingeridas por los neutrófilos fueron retirados mediante lavado del portaobjetos con tampón PBS. A continuación se trató el cubreobjetos con 1-estearoil LPC 30 μ M, y se continuó cultivando otra hora. En este punto, el cubreobjetos del grupo de control fue tratado con tampón PBS, en lugar de LPC. Posteriormente, tras cambiar por un nuevo medio RPMI-1640, se continuó con el cultivo durante otra hora para proporcionar tiempo de muerte. A continuación los neutrófilos fueron destruidos usando Triton X-100 (0,05%) y se recuperaron las células de *E. coli*. Las células de *E. coli* recuperadas fueron distribuidas sobre una placa y se cultivaron en incubadora mantenida a 37°C. Se contabilizaron las células de *E. coli* que habían crecido sobre el medio y se realizó un análisis estadístico. Como resultado, tal como se muestra en la Figura 11, en el grupo experimental que fue tratado con LPC, disminuyó significativamente el número de *E. coli* vivas. Esto indica que la LPC aumenta la capacidad bactericida de los neutrófilos mediante la estimulación directa de los neutrófilos. En consecuencia, se puede observar que la LPC bloquea la apoptosis de

neutrófilos suprimida, inhibe la liberación de IL-8 en neutrófilos/monocitos y también incrementa la actividad bactericida de los neutrófilos.

Aplicabilidad industrial

- 5 Tal como se ha descrito, en la presente invención se ha identificado que la LPC, ligando agonista específico para el receptor G2A, puede inhibir de manera efectiva la anti-apoptosis de neutrófilos y la liberación excesiva de IL-8. Adicionalmente, se ha revelado que los ligandos agonistas según la presente invención pueden eliminar de manera eficaz patógenos en infecciones microbianas aumentando la actividad bactericida de los neutrófilos. Por consiguiente, los ligandos agonistas específicos para el receptor G2A según la presente invención y una composición farmacéutica o terapéutica que comprenda dichos ligandos pueden usarse de manera muy eficaz en el
- 10 tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la acumulación de neutrófilos y/o a la liberación excesiva de IL-8, especialmente de la enfermedad inflamatoria sepsis, o de una enfermedad asociada a infección microbiana según las reivindicaciones.

Listado de secuencias

<110> BioSynergen, Inc.

5 <120> Nuevo uso terapéutico de ligandos agonistas específicos para el receptor G2A
 <130> OP03-0045
 <160> 4

10 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 23
 15 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador directo para el receptor G2A

20 <400> 1
 gctcagcagg actcctcaat cag 23

25 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> cebador inverso para el receptor G2A
 <400> 2

35 cggtggtgtcatctccta 20
 <210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador directo para el receptor GPR4

45 <400> 3
 ggcaaccacacgtggag 18
 <210> 4
 50 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> cebador inverso para el receptor GPR4
 <400> 4

60 tccagttgtcgtggtgcag 19

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un compuesto para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a la supresión de la apoptosis de neutrófilos o a la liberación excesiva de IL-8 seleccionada entre sepsis y choque séptico, en un sujeto, donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 18:0 LPC (también denominada: 1-estearoil lisofosfatidilcolina; L- α -Lisofosfatidilcolina estearoilo; Lisolectina estearoilo), 18:1 LPC (también denominada: 1-oleoil lisofosfatidilcolina; L- α -Lisofosfatidilcolina oleoilo; Lisolectina oleoilo); 14:0 LPC (también denominada: 1-miristoil lisofosfatidilcolina; L- α -Lisofosfatidilcolina miristoilo), y 16:0 LPC (también denominada: 1-palmitoil lisofosfatidilcolina; L- α -Lisofosfatidilcolina palmitoilo; Lisolectina palmitoilo; DL- α -Lisofosfatidilcolina palmitoilo).
- 10 **2.** El uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la supresión de la apoptosis de neutrófilos o a la liberación excesiva de IL-8 seleccionada entre sepsis y choque séptico, en un sujeto, donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 18:0 LPC (también denominada: 1-estearoil lisofosfatidilcolina; L- α -Lisofosfatidilcolina estearoilo; Lisolectina estearoilo), 18:1 LPC (también denominada: 1-oleoil lisofosfatidilcolina; L- α -Lisofosfatidilcolina oleoilo; Lisolectina oleoilo); 14:0 LPC (también denominada: 1-miristoil lisofosfatidilcolina; L- α -Lisofosfatidilcolina miristoilo), y 16:0 LPC (también denominada: 1-palmitoil lisofosfatidilcolina; L- α -Lisofosfatidilcolina palmitoilo; Lisolectina palmitoilo; DL- α -Lisofosfatidilcolina palmitoilo).
- 15 **3.** Un compuesto para el uso reivindicado en la Reivindicación 1 ó el uso reivindicado en la Reivindicación 2, donde la cantidad efectiva del compuesto oscila entre 0,01 y 100 mg por kg del sujeto, y el compuesto es para administración parenteral u oral.

20

FIGURA 1

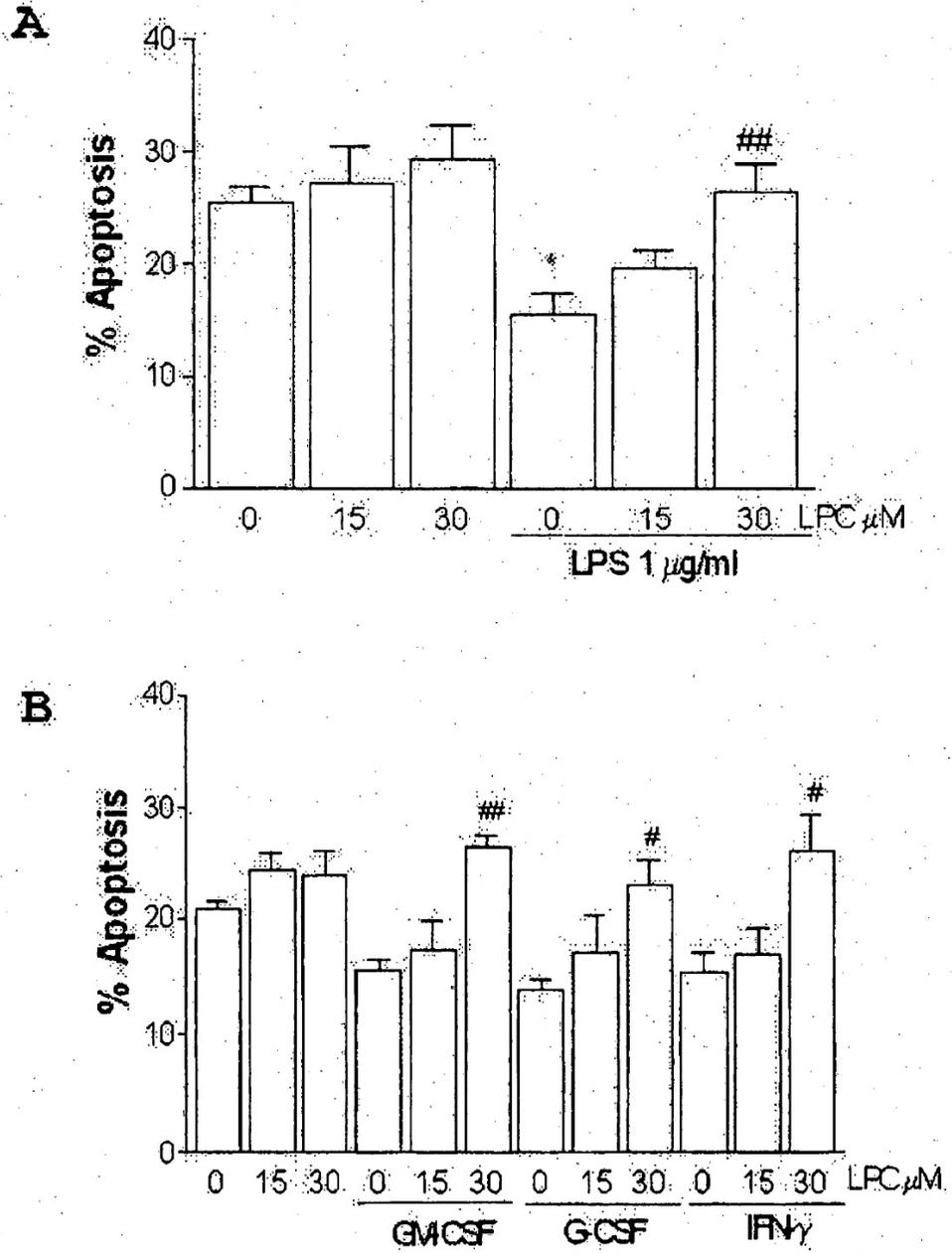
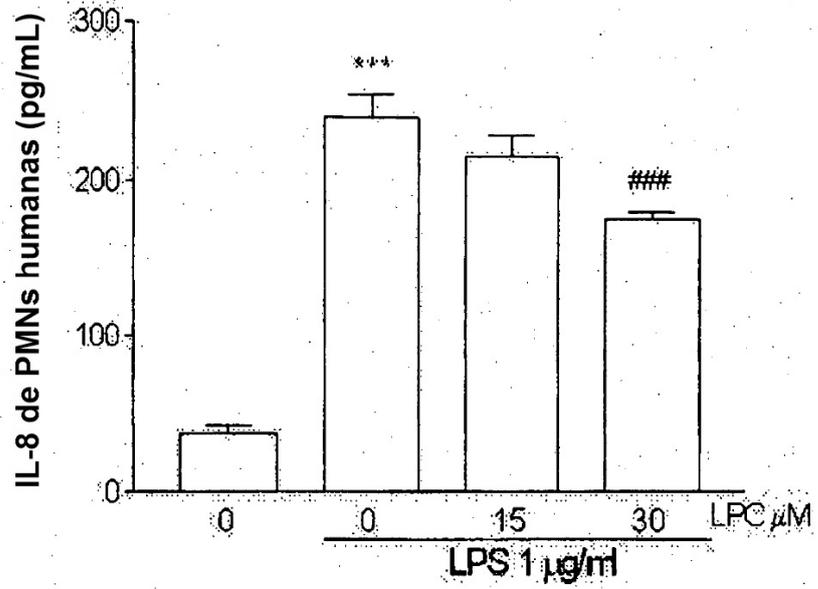


FIGURA 2

A



B

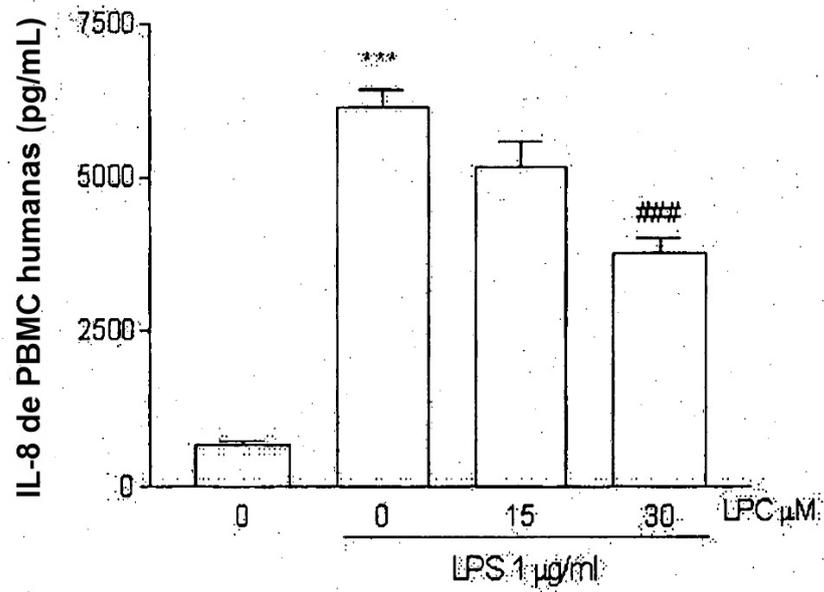


FIGURA 3

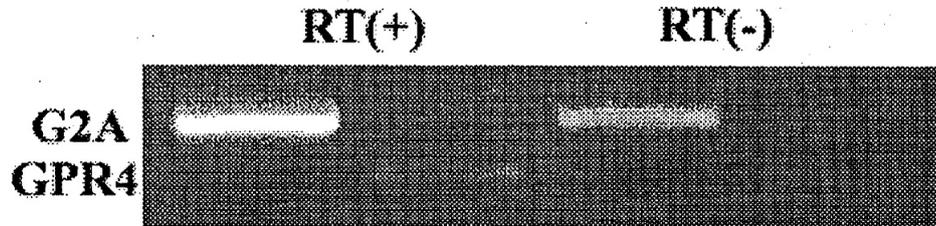


FIGURA 4

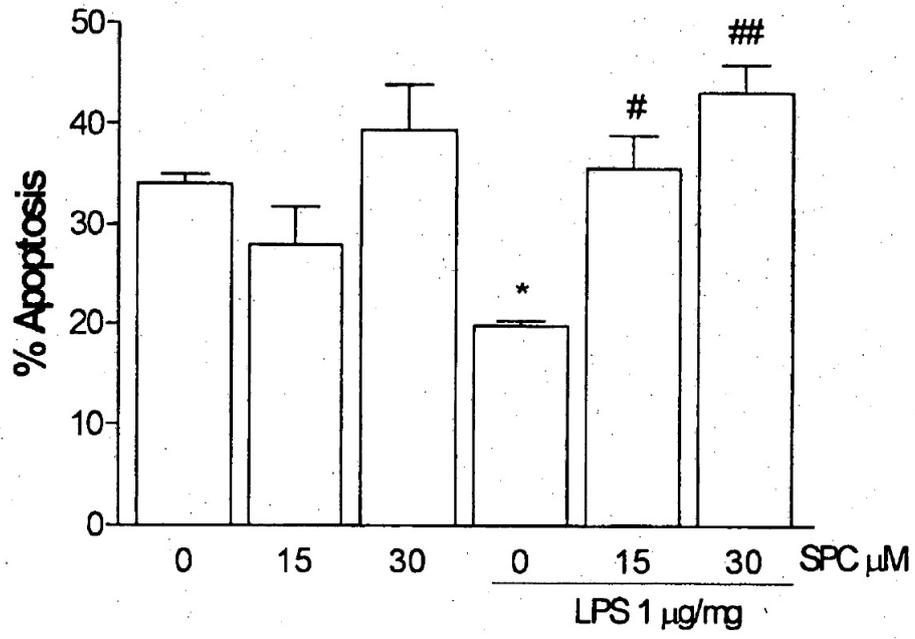


FIGURA 5

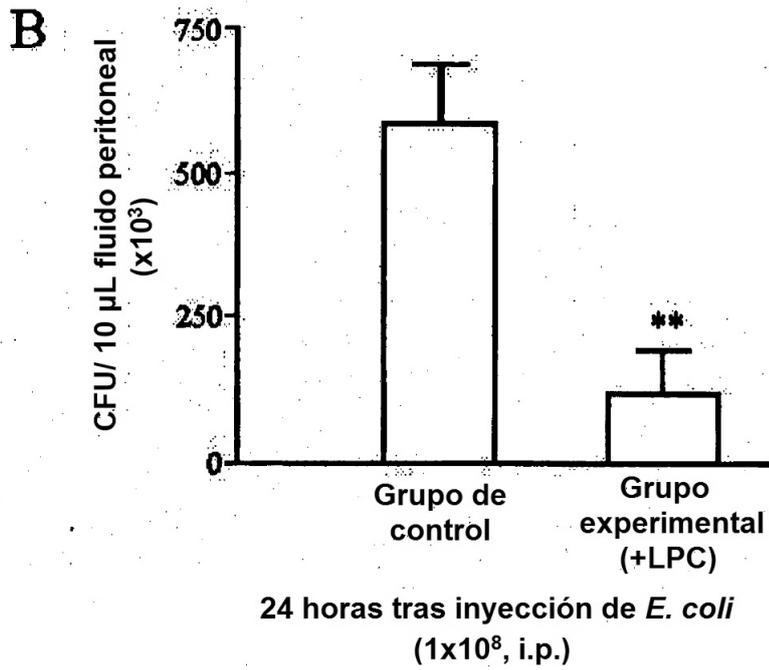
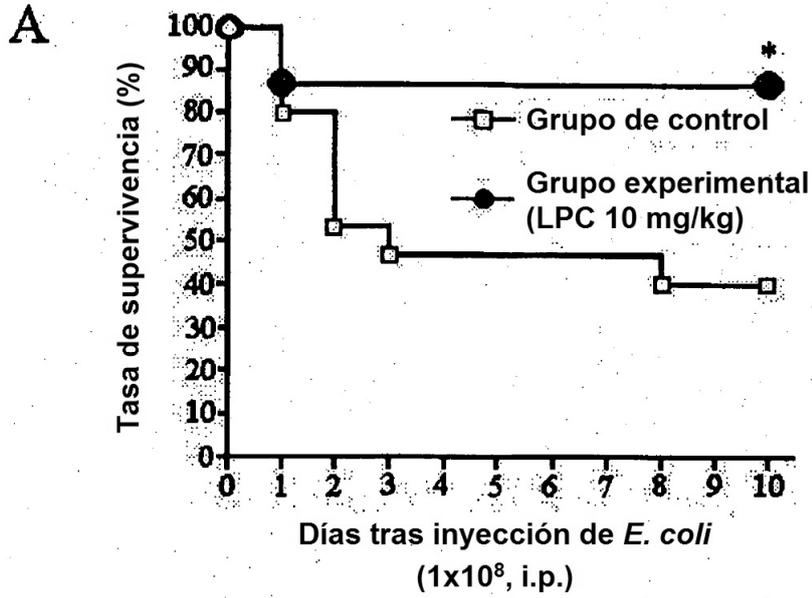


FIGURA 6

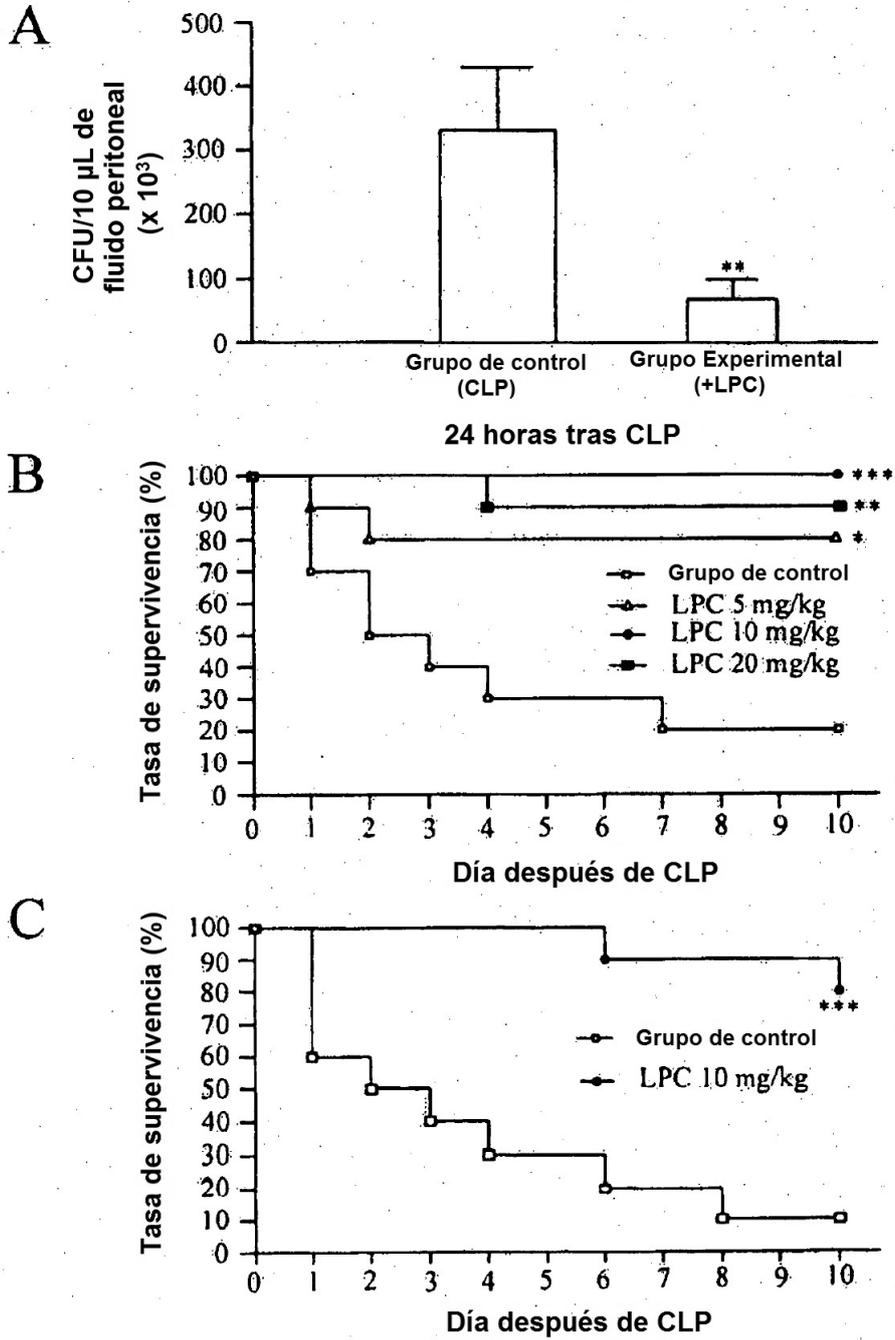


FIGURA 7

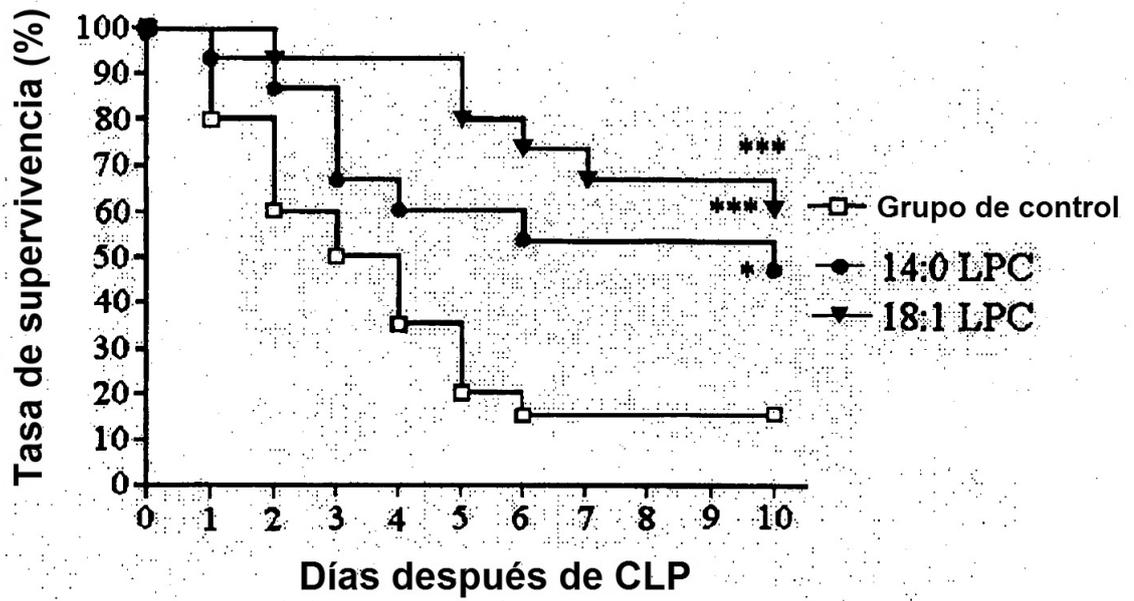


FIGURA 8

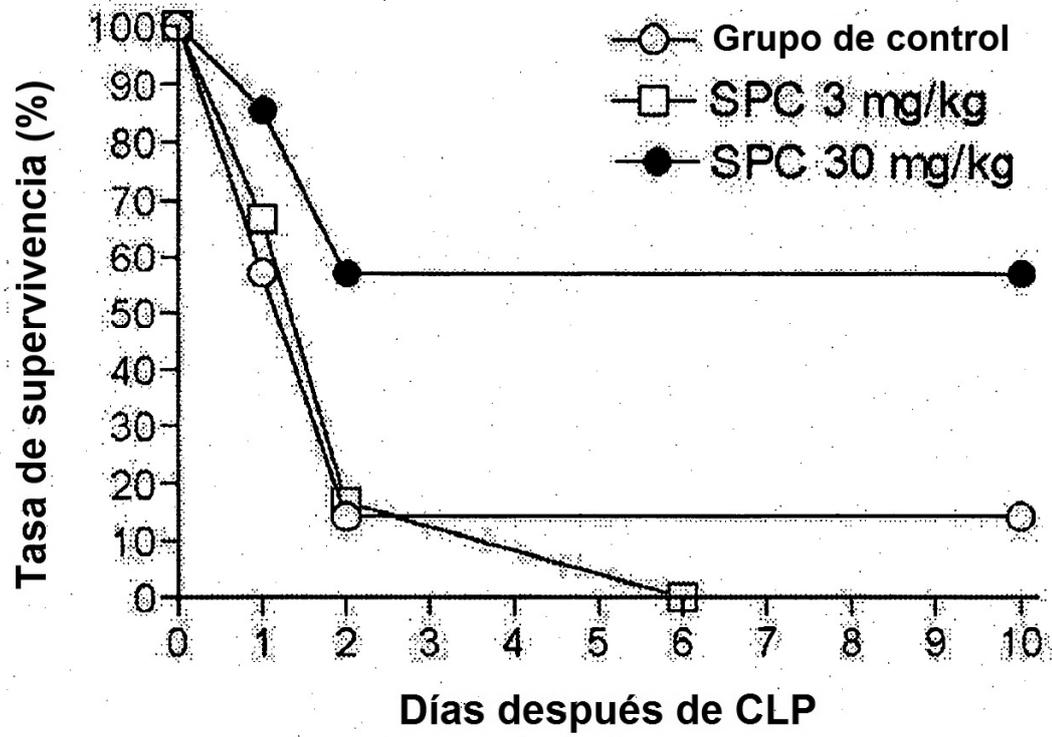


FIGURA 9

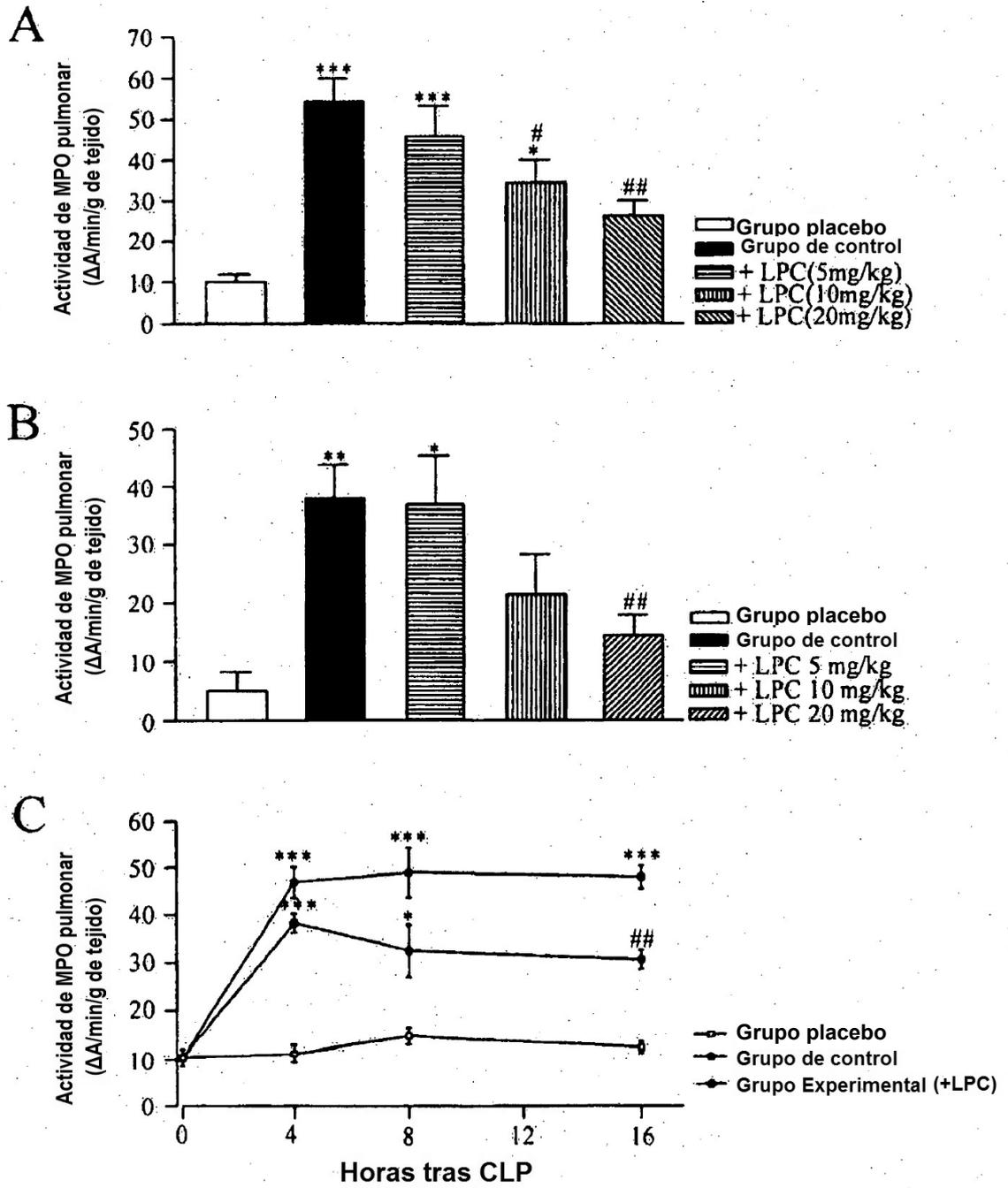


FIGURA 10

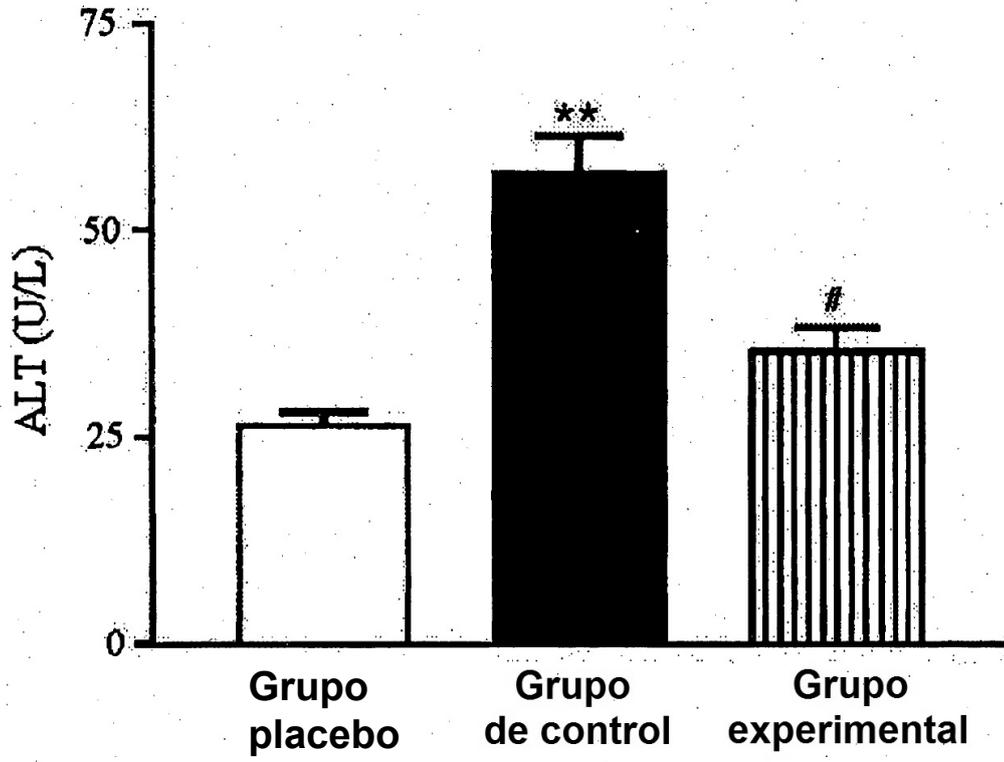


FIGURA 11

