

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 167**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 38/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2008 E 08826168 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2185581**

54 Título: **Métodos y composiciones útiles en el tratamiento de mucositis**

30 Prioridad:

**06.07.2007 US 958634 P**

**20.07.2007 US 961343 P**

**27.06.2008 US 215700**

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

**16.12.2015**

73 Titular/es:

**PROMEDIOR INC. (100.0%)**

**101 Hartwell Avenue**

**Lexington, MA 02421-3125, US**

72 Inventor/es:

**HESSON, DAVID, PAUL y**

**KRAMER, MICHAEL, SCOTT**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 554 167 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

Métodos y composiciones útiles en el tratamiento de mucositis

5 **Antecedentes de la invención**

La mucositis es una afección caracterizada por inflamación, irritación y molestia de los revestimientos mucosos tal como los del aparato digestivo y las cavidades oral y orofaríngea, y puede producir llagas en la boca y garganta, diarrea, cólicos y dolores abdominales, y úlceras rectales. Esta afección se produce en aproximadamente la mitad de todos los pacientes de cáncer sometidos a terapia, y es un efecto secundario común de tratamientos contra el cáncer que implican radiación y/o quimioterapia. El fin de estos enfoques al tratamiento contra el cáncer es destruir las células cancerosas que se dividen rápidamente pero, desgraciadamente, otras células que se dividen rápidamente también se destruyen por el tratamiento, incluyendo las células que revisten regiones tal como el aparato digestivo, lo que produce mucositis.

La incidencia de la mucositis, así como su gravedad, depende de factores tales como el tipo y duración del tratamiento contra el cáncer. La mucositis se produce, por ejemplo, en virtualmente todos los pacientes que son tratados por irradiación de la cabeza y el cuello. También es muy prevalente en pacientes tratados con quimioterapia y/o irradiación de alta dosis con el fin de mieloablación, tal como en la preparación para trasplante de células madre o médula ósea.

La mucositis impacta negativamente en la calidad de vida de los pacientes de cáncer de varias maneras. Por ejemplo, las llagas en la boca y garganta de la mucositis pueden producir dolor significativo y hacen difícil comer, beber, e incluso tomar medicación oral. La mucositis también está acompañada por un grave riesgo de infección, ya que puede producir una brecha en los revestimientos de otra forma protectores de la mucosa oral y el aparato digestivo, que son colonizados por un amplio conjunto de microorganismos. La toxicidad intestinal es un factor limitante principal en las pautas de tratamiento de radiación y quimioterapia. Además, los esfuerzos para contrarrestar las molestias de la mucositis pueden producir interrupciones en el tratamiento contra el cáncer, alteraciones en las dosis de tratamiento, o cambios a diferentes modos de tratamiento. La mucositis grave también puede producir la necesidad de nutrición parenteral u hospitalización. El desarrollo de enfoques eficaces para prevenir y tratar la mucositis es por tanto importante para mejorar el cuidado de los pacientes de cáncer.

Mucositis alimentaria se refiere a una forma de lesión de la barrea mucosa al aparato digestivo. La mucositis alimentaria se puede producir en una parte o múltiples partes del aparato digestivo, desde la boca al ano, a través, por ejemplo, esófago, estómago, intestino delgado, colon y recto. Los ejemplos no limitantes de mucositis alimentaria son mucositis oral, esofagitis, estomatitis, enteritis, y proctitis. Véase, por ejemplo, Blijlevens et al., Bone Marrow Transplant 25:1269-1278 (2000); y Keefe et al., Seminars in Oncology 20:38-47 (2004).

Las mucositis alimentarias generalmente están causadas por una o más agresiones, más comúnmente por una sustancia(s) química(s) o radiación, o una combinación de las mismas. La radiación puede ser el resultado de, por ejemplo, terapia de radiación, exposición a radiación accidental, y exposición a radiación de un ataque terrorista. Véase, por ejemplo, Moulder, Int. J. Radiat. Biol. 80:3-10 (2004). Las agresiones químicas son comúnmente de quimioterapia.

45 **Compendio de la invención**

En parte, la divulgación demuestra que polipéptidos SAP son útiles en un tratamiento para mucositis. Un aspecto de la invención proporciona métodos para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la mucositis en un paciente administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de SAP. La administración de un polipéptido SAP puede retrasar el desarrollo de mucositis, reducir el número de días que un paciente está afectado con mucositis, y/o reducir la gravedad de la mucositis.

La solicitud proporciona métodos para tratar pacientes afectados con mucositis, así como pacientes en riesgo de desarrollar mucositis. La terapia contra el cáncer con radiación, la quimioterapia, o una combinación de las mismas son tratamientos asociados con un alto riesgo de efectos secundarios relacionados con mucositis. La administración de polipéptidos SAP puede comenzar antes, al mismo tiempo, o después del tratamiento con terapia de radiación o quimioterapia. En algunas formas de realización, los pacientes están afectados con cáncer. En algunas formas de realización, los pacientes están afectados con cáncer de pulmón, ovario, próstata, linfoma o gastrointestinal. En algunas formas de realización, los pacientes están afectados con cáncer de cabeza y cuello o cáncer que requiere un trasplante de médula ósea, tal como terapia de mieloablación.

La solicitud proporciona métodos para tratar o prevenir un número de trastornos relacionados. Los métodos de la invención son útiles para tratar mucositis oral, esofágica, y gastrointestinal, así como úlceras gástricas y duodenales, o erosiones del estómago y esófago.

65

La solicitud proporciona polipéptidos SAP útiles en los métodos de la invención. Los polipéptidos SAP pueden aumentar o mimetizar la señalización de SAP o aumentar la actividad de SAP.

#### Breve descripción de las figuras.

5 La **figura 1 (A-C)** representa la tinción de hematoxilina y eosina de un modelo de rata de enteropatía inducida por radiación. Tinción de los intestinos de ratas control sin radiar (Fig. 1A), irradiadas tratadas con vehículo (Fig. 1B) y tratadas con hSAP (Fig. 1C).

10 La **figura 2** representa el área de la superficie de mucosa dos semanas después del tratamiento con radiación en ratas tratadas con hSAP y tratadas con vehículo irradiadas.

La **figura 3** representa el espesor subseroso dos semanas después del tratamiento con radiación en ratas tratadas con hSAP y tratadas con vehículo irradiadas.

15 La **figura 4** representa la puntuación de lesión de radiación dos semanas después del tratamiento con radiación en ratas tratadas con hSAP y tratadas con vehículo irradiadas.

20 La **figura 5** representa la inmunorreactividad del colágeno de tipo III dos semanas después del tratamiento con radiación en ratas tratadas con hSAP y tratadas con vehículo irradiadas.

La **figura 6** representa las puntuaciones de mucositis con enmascaramiento medias en el modelo de bolsa de mejilla de hámster de mucositis oral inducida por radiación.

25 La **figura 7** representa las puntuaciones de mucositis con enmascaramiento medias en el modelo de bolsa de mejilla de hámster de mucositis oral inducida por radiación.

La **figura 8** representa las puntuaciones de mucositis con enmascaramiento medias en el modelo de bolsa de mejilla de hámster de mucositis oral inducida por radiación.

30 La **figura 9** representa el alineamiento de secuencias de aminoácidos de polipéptidos amiloide P sérico humano (SEQ ID NO: 1, aminoácidos 20-223 del No. de acceso a Genbank NP\_001630), Gallus gallus (SEQ ID NO: 2, aminoácidos 20-227 del No. de acceso a Genbank NP\_001034653), Bos taurus (SEQ ID NO: 3, aminoácidos 20-224 del No. de acceso a Genbank AAI02624), y Cricetulus migratorius (SEQ ID NO: 4, aminoácidos 20-223 del No. de acceso a Genbank AAB28726) (la secuencia señal no se representa). Los aminoácidos idénticos a SAP humano están sombreados.

#### Descripción detallada de la invención

##### 40 Visión general

Un aspecto de la presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que el amiloide P sérico (SAP) demuestra un efecto terapéutico en el tratamiento de mucositis.

45 El amiloide P sérico ("SAP") es una proteína del suero natural en mamíferos compuesta de cinco subunidades idénticas o protómeros que están asociadas de forma no covalente en una molécula de tipo disco. SAP es una glucoproteína pentamérica de 125.000 Dalton compuesta de cinco protómeros de 25.000 Dalton unidos de forma no covalente. SAP pertenece a la superfamilia de pentraxina de proteínas, caracterizada por esta estructura pentamérica cíclica. Las pentraxinas cortas clásicas incluyen SAP así como proteína C reactiva (Osmand, A. P., et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 74:739-743 (1977)). Se sintetiza en el hígado y la semivida fisiológica de SAP humano es 24 horas. La secuencia de la subunidad de SAP humano se representa en SEQ ID NO: 1 (aminoácidos 20-23 del No. de acceso a Genbank NP\_001630, la secuencia señal no está representada).

##### Definiciones

55 Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno de mucositis y/o efecto secundario atribuible al trastorno. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) aumentar el tiempo de supervivencia; (b) disminuir el riesgo de muerte debido a la enfermedad; (c) prevenir que la enfermedad se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero aún no ha sido diagnosticado como que la tiene; (d) inhibir la enfermedad, es decir, parar su desarrollo (por ejemplo, reducir la velocidad de progresión de la enfermedad); y (e) aliviar la enfermedad, es decir, 60 causar la regresión de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, un terapéutico que “previene” un trastorno o afección es un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada relativo a una muestra control sin tratar, o retrasa el inicio o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección relativo a la muestra control sin tratar.

5 Como se usan en el presente documento los términos “sujeto” y “paciente” se refieren a animales incluyendo mamíferos, en particular seres humanos. El término “mamífero” incluye primates, animales domesticados incluyendo perros, gatos, ovejas, ganado, cabras, cerdos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, cobayas, animales cautivos tal como animales de zoo, y animales salvajes. Como se usa en el presente documento el término “tejido” se refiere a un órgano o conjunto de células especializadas tal como tejido de la piel, tejido pulmonar, tejido renal y otros tipos de células.

15 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad de agentes terapéuticos, o una velocidad de administración de tales agentes terapéuticos, eficaz para facilitar un efecto terapéutico deseado. El efecto terapéutico deseado preciso variará según la afección relacionada con mucositis que se va a tratar, la formulación que se va a administrar, y una variedad de otros factores que aprecian los expertos en la materia.

### Métodos de tratamiento

20 Un aspecto de la solicitud proporciona métodos para tratar, prevenir, o reducir la gravedad de mucositis en un paciente, el método comprende administrar a un paciente en necesidad de ello, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido SAP.

25 En algunas formas de realización, la administración de un polipéptido SAP reduce el número de días que un paciente está afectado con mucositis. En algunas formas de realización, la administración de un agonista de SAP retrasa el desarrollo de mucositis. La mucositis que resulta como un efecto secundario al tratamiento contra el cáncer, generalmente aparece unos pocos días después del inicio del tratamiento y puede llevar de dos a cuatro semanas después de la suspensión del tratamiento que desaparezca. En algunas formas de realización, la administración de un polipéptido SAP retrasa el desarrollo de mucositis en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o más días. En algunas formas de realización, la administración de un polipéptido SAP reduce el número de días que un paciente está afectado con mucositis en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o más días. En algunas formas de realización, la administración de un agonista de SAP acelera la resolución de mucositis.

35 En algunas formas de realización, la administración de un agonista de SAP reduce la gravedad de la mucositis en al menos un grado según el Instituto Nacional del Cáncer-Criterios de Toxicidad Comunes (NCI-CTC). Existen varias escalas de evaluación para la clasificación objetiva de mucositis, incluyendo la Organización Mundial de la Salud, el Grupo de Oncología de Terapia de Radiación, la escala de análogo visual, la escala de mucositis oral y la escala de evaluación de mucositis oral, véase, Sonis, ST, et al. Cancer. 100:1995-2025 (2004) para una revisión. El NCI-CTC proporciona un sistema de graduación desde 1-5 para la mucositis oral y desde 1-4 para la mucositis gastrointestinal. El experto en la materia es capaz de evaluar la evolución de la enfermedad en un paciente para determinar la gravedad de la mucositis.

45 Un polipéptido SAP se puede administrar a sujetos que han recibido recientemente o es probable que reciban dosis de radiación o toxina. En una forma de realización, la dosis de radiación o toxina se recibe como parte de un procedimiento laboral o médico, por ejemplo, trabajar en una central nuclear, volar un avión, rayos X, escáner TAC, o la administración de un colorante radioactivo para imagenología médica; en tal forma de realización, el polipéptido SAP se administra como una medida profiláctica. En otra forma de realización, la exposición a la radiación o toxina se recibe inintencionadamente, por ejemplo, como resultado de un accidente industrial, habitar en una localización de radiación natural, acto terrorista, o acto de guerra que implica material radioactivo o tóxico. En tal caso, el polipéptido SAP preferiblemente se administra tan pronto como sea posible después de la exposición para inhibir la apoptosis y el posterior desarrollo de síndrome de radiación agudo.

55 Mientras que los métodos se pueden usar para tratar pacientes afectados con mucositis, en algunas formas de realización, los métodos también se llevan a cabo con pacientes que no tienen, pero están en riesgo de desarrollar mucositis (por ejemplo, pacientes de cáncer u otros programados para recibir, que reciben actualmente, o tratados previamente con radiación y/o quimioterapia). En pacientes en riesgo de desarrollar mucositis, el tratamiento según la invención puede reducir la gravedad de la mucositis resultante de su tratamiento, inhibir el desarrollo de mucositis, o prevenir el inicio de mucositis. En algunas formas de realización, el tratamiento con un polipéptido SAP retrasa el inicio de los síntomas de mucositis en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o más días. En algunas formas de realización, el tratamiento reduce el número de días que un paciente está afectado con mucositis en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, o más días. En algunas formas de realización, el tratamiento reduce la gravedad de la mucositis en al menos un grado según el sistema de clasificación NCI-CTC.

65 Según los métodos de la invención, un polipéptido SAP se administra a un paciente antes, durante y/o después del tratamiento con una terapia que produce mucositis (por ejemplo, mucositis oral, alimentaria o gastrointestinal) o pone al paciente en riesgo de desarrollar tal mucositis. Como se ha indicado anteriormente, tales tratamientos incluyen

radiación y quimioterapia, que actúan bloqueando el crecimiento de células que se dividen rápidamente, tal como células cancerosas y células epiteliales que revisten las superficies de los aparatos digestivo, respiratorio y genitourinario. Los ejemplos específicos de tratamientos que pueden producir mucositis incluyen tratamiento de radiación (por ejemplo, radiación de cabeza y/o cuello, cuerpo entero, dirigida, y/o hiperfraccionada), así como pautas quimioterapéuticas usadas en el tratamiento de, o como tratamientos adyuvantes para, afecciones tal como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer genitourinario (por ejemplo, de vejiga, próstata o testicular), cáncer ginecológico (por ejemplo, cervical, endometrio, ovárico, o uterino), cáncer de cabeza y cuello/esofágico, leucemia, cáncer de pulmón (microcítico o no microcítico), linfoma (de Hodgkin o no hodgkiniano), melanoma, mieloma múltiple, cáncer pancreático, y sarcoma. La terapia mieloablativa en la preparación para trasplante de médula ósea también puede producir mucositis.

Como se sabe en la técnica, se pueden tratar cánceres tales como estos usando enfoques que implican inmunoterapia mediante el uso de agentes tal como, por ejemplo, rituximab, cetuximab o bevacizumab, solos o en combinación con quimioterapia o terapia de radiación. En otros ejemplos, los enfoques quimioterapéuticos que pueden inducir mucositis incluyen los que utilizan (sea como agentes únicos o en combinaciones) derivados de platino tal como carboplatino, cisplatino, y oxaplatino; inhibidores de mitosis tal como paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, vincristina, y vinblastina; inhibidores de topoisomerasas tal como epotósido, irinotecano, y topotecano; antimetabolitos tal como gemcitabina, capecitabina, fludarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo, cladribina, pentostatina, y citarabina; inhibidores de la síntesis de ADN tal como doxorubicina, epirrubicina, idarrubicina, daunorubicina, bleomicina, mecloretamina, y mitoxantrona; agentes alquilantes tal como ciclofosfamida, ifosfamida, y melfalán carmustina; oncológicos hormonales tal como estramustina; y agentes que tienen otros mecanismos o desconocidos tal como dacarbacina. El uso de estos y otros enfoques para tratar el cáncer lo conocen bien los expertos en la materia.

El tratamiento según la invención puede empezar antes del tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, 1-2 días o 1 semana antes del tratamiento contra el cáncer), al o casi al mismo tiempo que el tratamiento contra el cáncer (por ejemplo simultáneamente con, a las 1-4 horas de, o el mismo día que el tratamiento contra el cáncer), o poco después de la suspensión del tratamiento contra el cáncer (por ejemplo, a los 1-4 días después de la suspensión del tratamiento y/o antes de o tras la aparición de síntomas). El tratamiento se puede mantener después, por ejemplo, hasta que cualquier síntoma de la mucositis ha desaparecido sustancialmente o el riesgo de desarrollar tales síntomas ha pasado. Por tanto, el tratamiento iniciado antes o al o casi al mismo tiempo que el tratamiento contra el cáncer, se puede mantener, por ejemplo, durante varios días. En otros ejemplos, el tratamiento se mantiene durante 1, 2, 3, 4 o más semanas después de la suspensión del tratamiento contra el cáncer, según determine que es apropiado el experto en la materia. En ejemplos específicos, el tratamiento según la presente invención se lleva a cabo antes del tratamiento contra el cáncer solo; antes de y al mismo tiempo que el tratamiento contra el cáncer solo; antes de, al mismo tiempo que, y después de la suspensión del tratamiento contra el cáncer; al mismo tiempo que el tratamiento contra el cáncer solo; al mismo tiempo que y después de la suspensión del tratamiento contra el cáncer solo; después de la suspensión del tratamiento contra el cáncer solo; o antes de y después de la suspensión del tratamiento contra el cáncer solo. Además, el tratamiento según los métodos de la invención, se puede alterar, parar, o reiniciar en un paciente, dependiendo del estado de cualquier síntoma de mucositis. El tratamiento se puede llevar a cabo en intervalos que los expertos en la materia han determinados que son apropiados. Por ejemplo, la administración se puede llevar a cabo 1, 2, 3, o 4 veces o más /día.

La solicitud proporciona polipéptidos SAP útiles para el tratamiento de mucositis y trastornos relacionados con mucositis. La mucositis puede ser oral, gastrointestinal o esofágica. Los trastornos que se pueden tratar con agonistas de SAP incluyen úlceras gástricas y duodenales, erosiones del estómago y esófago, colitis, reflujo gastroesofágico, y enfermedad intestinal inflamatoria. En algunas formas de realización, la enfermedad intestinal inflamatoria es enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

(i) *Amiloide P sérico humano*

En ciertas formas de realización, el polipéptido SAP es SAP que comprende cinco protómeros de SAP humanos (SEQ ID NO: 1). El término "protómero de SAP" se pretende que se refiera a un polipéptido que es al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, al menos el 99% o el 100% idéntico al protómero de SAP humano (SEQ ID NO: 1), determinado usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (*Comp. App. Biosci.*, 6:237-245 (1990)). En una forma de realización específica, los parámetros empleados para calcular el porcentaje de identidad y similitud de un alineamiento de aminoácidos comprenden: Matriz = PAM 150, k-tupla = 2, penalización por mal emparejamiento = 1, penalización por unión = 20, longitud de grupo de aleatorización = 0, puntuación de corte = 1, penalización por hueco = 5 y penalización por tamaño d hueco = 0,05. El término "protómero de SAP" abarca fragmentos funcionales y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de los anteriores. Generalmente, se diseñará un protómero de SAP que sea soluble en soluciones acuosas a temperaturas, niveles de pH y osmolaridad biológicamente relevantes. Los protómeros que se asocian de forma no covalente entre sí para formar SAP pueden tener idénticas secuencias de aminoácidos y/o modificaciones postraduccionales o, alternativamente, los protómeros individuales pueden tener diferentes secuencias y/o modificaciones.

Algunos aspectos de la invención proporcionan polipéptidos, o proporcionan métodos terapéuticos para emplear esos polipéptidos, en donde dichos polipéptidos se definen, al menos en parte, respecto a una secuencia de referencia. Según esto, tales polipéptidos pueden tener un cierto porcentaje de residuos de aminoácidos que no son idénticos a una secuencia de referencia. En algunas formas de realización, los residuos no idénticos tienen similares propiedades químicas que los residuos a los que no son idénticos. Los grupos que tienen propiedades similares incluyen los siguientes aminoácidos: E, D, N, Q; H, K, R; Y, F y W; I, L, V, M, C, A; y S, T, C, P, A.

En algunas formas de realización, los residuos que no son idénticos son los que no están evolutivamente conservados entre la secuencia de referencia y una secuencia ortóloga en al menos una especie evolutivamente relacionada, tal como en especies en el mismo orden. En el caso de una secuencia de referencia de vertebrados, los aminoácidos que se pueden mutar en una forma de realización preferida son los que no están conservados entre la secuencia de referencia y la secuencia ortóloga en otra especie de vertebrado. Por ejemplo, si un polipéptido usado en un método de la presente invención se dice que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a SAP humano (SEQ ID NO: 1), entonces dicho polipéptido puede tener residuos no idénticos en esas posiciones en las que SAP humano y el de otro vertebrado se diferencian. La figura 9 representa SAP humano alineado contra dos secuencias de SAP de mamíferos y una aviar. Los residuos sin sombrear indican residuos que se diferencian de la secuencia de SAP humana.

Los polipéptidos que comparten al menos el 95% de identidad con SEQ ID NO: 1 incluyen polipéptidos que tienen sustituciones conservadoras en estas áreas de divergencia. Típicamente vistas como sustituciones conservadoras son las sustituciones, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile, intercambio de residuos hidroxilo Ser y Thr, intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu, sustitución entre residuos de amida Asn y Gln, intercambio de los residuos básicos Lys y Arg y sustituciones entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. Se puede encontrar orientación adicional respecto a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos en Bowie *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990).

En ciertas formas de realización, los polipéptidos SAP que comprenden polímeros que son al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97%, o al menos el 99% idénticos a SEQ ID NO: 1 aumentan la señalización de SAP.

En ciertas formas de realización, un agonista de señalización de SAP es una variante de SAP. El término "variante de SAP" se pretende que se refiera a una proteína que comprende de dos a cinco protómeros que demuestran una o más de las siguientes características comprado con el pentámero de SAP humano: semivida en plasma aumentada, estabilidad in vitro aumentada, o estabilidad in vivo aumentada relativo a SAP humano.

En formas de realización específicas de la presente invención, las composiciones que contienen SAP pueden ser operativas para aumentar la concentración de SAP en localizaciones diana hasta aproximadamente al menos 0,5 µg/ml. En seres humanos, se ha administrado previamente SAP radiomarcada con  $^{125}$ I a pacientes estudio con amiloidosis. En los tratamientos, se administraron aproximadamente 600 µg de SAP a un ser humano adulto. Según esto, la administración de aproximadamente 600 µg de SAP por vía sistémica a un ser humano adulto es segura. Dosis más altas también pueden ser seguras en condiciones apropiadas.

### Preparaciones y formulaciones farmacéuticas

En ciertas formas de realización, los métodos descritos en el presente documento implican la administración de un polipéptido SAP a un sujeto. El polipéptido SAP se puede formular de una manera convencional usando uno o más soportes o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, se pueden formular polipéptidos SAP para la administración por, por ejemplo, inyección (por ejemplo, subC, IM, IP), inhalación o insuflación (bien a través de la boca o de la nariz) o administración oral, yugal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. En ciertas formas de realización, los agonistas de SAP se pueden administrar localmente, en el sitio donde las células diana están presentes, es decir, en un tejido, órgano o líquido específico (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, masa tumoral, etc.).

Los polipéptidos SAP se pueden formular para una variedad de modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada. Se pueden encontrar técnicas y formulaciones en general en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA. Para la administración parenteral, se prefiere la inyección, incluyendo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, y subcutánea. Para inyección, los compuestos se pueden formular en soluciones líquidas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tal como solución de Hank o solución de Ringer. Además, los compuestos se pueden formular en forma sólida y redisolverse o resuspender inmediatamente antes del uso. También se incluyen las formas liofilizadas.

Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tal como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, fécula de patata o glicolato sódico de almidón); o

agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden recubrir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tal como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de ationd, ésteres oleaginosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampones, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular adecuadamente para dar liberación controlada del compuesto activo.

Para la administración por inhalación (por ejemplo, administración pulmonar), los agonistas de SAP se pueden administrar convenientemente en la forma de una presentación en spray de aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la forma farmacéutica se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los polipéptidos SAP se pueden formular para la administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, por en ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tal como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y pueden contener agentes formulatorios tal como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

Además, los polipéptidos SAP también se pueden formular como una preparación en depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo subcutánea o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los polipéptidos SAP se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

En ciertas formas de realización, los polipéptidos SAP se incorporan en una formulación tópica que contiene un soporte tópico que generalmente es adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquiera de tales materiales conocidos en la técnica. El soporte tópico se puede seleccionar de modo que proporcione la composición en la forma deseada, por ejemplo, como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, solución, o similar, y puede estar compuesta de un material de origen natural o sintético. Es preferible que el soporte seleccionado no afecte adversamente al principio activo u otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de soportes tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros solventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite de vaselina, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras, y similares.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender desde aproximadamente el 0,00001 al 100% tal como desde el 0,001 al 10% o desde el 0,1% al 5% en peso de uno o más polipéptidos SAP descritos en el presente documento. En ciertas formulaciones tópicas, el principio activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente el 0,25% en peso al 75% en peso de la formulación, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,25% en peso al 30% en peso de la formulación, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,5% en peso al 15% en peso de la formulación, y lo más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 1,0% en peso al 10% en peso de la formulación.

Un ejemplo de formulación para SAP humano (hSAP) sería 0,5-15 mg/ml de hSAP disuelto en agua para inyección que contiene Tris 1-20 mM, NaCl 140 mM con tampón a un pH de 7,0-9,0. Un ejemplo más preferido de formulación para SAP humano (hSAP) sería hSAP 5 mg/ml disuelto en agua para inyección que contiene Tris 10 mM, NaCl 140 mM con tampón fosfato a un pH de 8,0.

Los polipéptidos SAP descritos en el presente documento se pueden almacenar en medio sin oxígeno según métodos en la técnica.

### Tratamiento de combinación

Los métodos de la invención se pueden usar solos o junto con otros enfoques para reducir la gravedad de la mucositis. Por ejemplo, los métodos de la invención se pueden llevar a cabo en combinación con terapias antimicrobianas o antifúngicas, por ejemplo, terapias que implican la administración de antibióticos tal como

nistatina, anfotericina, aciclovir, valaciclovir, clotimazol, fluconazol, y compuestos de tetraciclina (incluye doxiciclina, minociclina, tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, demeclociclina, limeciclina, y sanciclina). Como un ejemplo específico de tal tratamiento, pacientes con cáncer de cabeza y cuello que reciben radioterapia tienen colonización de la región orofaríngea con bacterias gram negativas. La descontaminación selectiva de la cavidad oral con agentes antimicrobianos tiene el beneficio de reducir la mucositis oral asociada con la terapia de radiación, pero puede haber limitaciones respecto a los efectos beneficiosos de tal tratamiento. La terapia antimicrobiana puede destruir bacterias, pero no puede reducir la endotoxina, y de hecho puede realmente aumentar la endotoxina. Como la endotoxina es un potente mediador de la inflamación, puede contribuir al agravamiento de la mucositis y, por tanto, se puede usar el cotratamiento con un compuesto antiendotoxina (por ejemplo, un análogo de lípido A, tal como eritorano) y antibióticos como un enfoque más eficaz para tratar la mucositis oral en tales pacientes, según la invención.

Se han desarrollado pastillas de antibiótico diseñadas para disolverse en la boca y descontaminar la mucosa oral y se han recomendado ampliamente para reducir infecciones orales asociadas con mucositis. Las pastillas pueden contener polimixina E, tobramicina y anfotericina B, que juntas proporcionan un amplio espectro antibacteriano y cobertura antifúngica. Estas se conocen comúnmente como pastillas PTA o tabletas PTA. Hay evidencia que apoya el uso de pastillas PTA en prevenir complicaciones infecciosas de mucositis en pacientes de cáncer sometidos a radioterapia.

Se han desarrollado algunas terapias antivirales para tratar pacientes que padecen mucositis que tienen una infección vírica subyacente. Aciclovir es un agente antiviral que es activo contra la especie de herpes que comúnmente infecta las membranas de la mucosa oral en pacientes de cáncer inmunodeprimidos.

Se ha investigado IL-11 para mitigar los efectos mucotóxicos de la terapia de radiación y quimioterapia y ha demostrado actividad en ensayos animales pequeños. Según la presente invención, se administran IL-11, análogos y derivados de la misma, a pacientes junto con agonistas de SAP, bien de forma profiláctica o al inicio de los síntomas asociados con los trastornos anteriormente mencionados. Se pueden administrar IL-11 y polipéptidos SAP en soportes farmacéuticamente aceptables bien solo o en combinación con otros agentes convencionales útiles en aliviar los síntomas asociados con los trastornos anteriormente mencionados.

En una forma de realización, la presente invención comprende preparaciones de IL-11 y polipéptidos SAP que son adecuadas para la administración oral a la boca. Las preparaciones orales adecuadas se pueden preparar con soluciones acuosas tal como bicarbonato de sodio (por ejemplo, Brioschi.RTM.), o en geles y suspensiones para la administración tópica en la boca. Las preparaciones orales también pueden tomar la forma de parches para la administración de IL-11 y polipéptidos SAP a la boca mediante liberación sostenida. Las preparaciones orales adicionales pueden comprender IL-11 y polipéptidos SAP en forma de una pastilla o un comprimido sin recubrir que se retiene en la boca. Las preparaciones orales son particularmente adecuadas para trastornos y respuestas inflamatorias que implican la mucosa de la cabeza, cuello y/o boca. Tales afecciones incluyen mucositis oral. Tal condiciones pueden resultar, por ejemplo, de quimioterapia o radioterapia para cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico cervical o cáncer de pulmón.

En otras formas de realización, la presente invención comprende preparaciones de IL-11 y polipéptidos SAP que son adecuadas para la administración tópica para mucosa y/o dermis. Tales preparaciones tópicas se pueden preparar en forma de soluciones acuosas, geles, pomadas o cremas para la administración tópica, como geles y suspensiones para la administración cervical, como píldoras, comprimidos, cápsulas o supositorios para la liberación inmediata o sostenida al aparato digestivo, o en forma de solución para enema. Tales preparaciones tópicas son especialmente adecuadas para el tratamiento de trastornos que se relacionan con regiones locales, tal como mucositis gastrointestinal. Algunas de estas afecciones pueden resultar, por ejemplo, de quimioterapia y/o radioterapia para cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer esofágico cervical o cáncer de pulmón. Entre las razones por la que la administración local se puede preferir están la facilidad de administrar una formulación tópica comparada con la administración de formulaciones inyectables subcutáneas. En ciertas clases de pacientes, el perfil de toxicidad de los agentes quimioterapéuticos puede ser tal que la administración parenteral concurrente de IL-11 es relativamente inadecuada. Otros pacientes pueden tener afecciones médicas para las que el perfil de sucesos adversos de IL-11 parenteral es relativamente inadecuado.

Se pueden administrar dosis adecuadas de agonistas de IL-11 desde una vez a la semana hasta aproximadamente seis veces al día. El tratamiento puede continuar durante un periodo de entre un día y seis meses, o durante tanto tiempo como se juzgue necesario y seguro en el tratamiento de los trastornos anteriormente mencionados, como determina fácilmente mediante pruebas estándar el médico, dependiendo de la naturaleza del trastorno que se trata.

Los métodos de la invención también se pueden usar junto con terapias paliativas incluyendo el uso de enjuagues tópicos, geles, o pomadas que incluyen lidocaína, articaína y/o morfina, así como otros agentes analgésicos o antiinflamatorios. Los ejemplos específicos de otros agentes y enfoques que se pueden usar en combinación con agonistas de SAP, según los métodos de la invención, incluyen los siguientes: velafermina (CG53135/factor de crecimiento de fibroblastos-20/FGF-20, CuraGen), palifermina (factor de crecimiento de queratinocitos recombinante; rHuKGF; Kevivance<sup>TM</sup>; Amgen) y AES-14 (suspensión de L-glutamina de captación aumentada) (Peterson, J.

Support Oncol. 4(2 Suppl. 1)9-13, 2006); crioterapia oral (incluyendo beta-caroteno, vitamina E, oxpentifilina, clorhidrato de acelastina, y prostaglandinas E1 y E2), terapia laser de bajo nivel, clorhexidina, amifostina, factores de crecimiento hematológicos, pentoxifilina, y glutamina (Saadeh, *Pharmacotherapy* 25(4):540-554, 2005); amifostina, pasta o pastilla de antibióticos, enzimas hidrolíticas, chips de hielo, bencidamina, fosfato de calcio, miel, protocolos de cuidado oral, povidona, y sulfato de zinc (Worthington et al., *Cochrane Database Syst. Rev.* 2:CD000978, 2006); flurbiprofeno (por ejemplo, administrado como un parche dental; Stokman et al., *Support Care Cancer* 13(1):42-48, 2005); difenhidramina, hidróxido de magnesio/hidróxido de aluminio, nistatina, y corticosteroides (Chan et al., *J. Oncol. Pharm. Pract.* 11 (4):139-143, 2005) incluyendo prednisona (para terapia sistémica a corto plazo), fluciconida y globetamol (para terapia tópica), y elixir de dexametasona (para terapia oral); citrato de fentanilo transmucosa oral (por ejemplo, administrado en forma de una pastilla; Shaiova et al., *Support Care Cancer* 12(4):268-273, 2004); clonazepam (por ejemplo, en forma de un comprimido; Gremeau-Richard et al., *Pain* 108(102):51-57, 2004); capsaicina (por ejemplo, en forma de una pastilla; Okuno et al., *J. Cancer Integr. Med.* 2(3):179-183, 2004); ketamina (por ejemplo, en forma de un enjuague oral; Slatkin et al., *Pain Med.* 4(3):298-303, 2003); y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF)/factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento transformante-B 3 (TGF-B 3), factor de crecimiento de queratinocitos 1, terapia de luz láser, N-acetilcisteína (NAC, Lappas, 2003. *J. Clin Endocrinology Metab*) y suplementos de glutamina (Duncan et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18(9):853-874, 2003); agentes de barrera y recubrimiento de mucosa (incluyendo sucralfato, alginato de sodio, caolín-pectina, película de envolver de plástico, guardas de radiación, y antiácidos); manzanilla; alouprinol; propantelina; nitrato de plata antagonistas de COX-1 o COX-2 (incluyendo indometacina y flurbiprofina); antagonista de IL-6, un antagonista de TNF- $\alpha$ ; antagonista de L-1, antagonista de interferón-gamma; antagonista de NO (aminoguanidina y guanidina); antagonista de células cebadas (antihistaminas, inhibidores de serina proteasa, o inhibidores de desgranulación); compuestos de aminofosforotioato o aminoalquiltiol; resveratrol; antagonista de NF- $\kappa$ B; angiotensinógeno, angiotensina I (AI), análogos de AI, fragmentos de AI y análogos de los mismos, angiotensina II (AII), análogos de AII, fragmentos de AII o análogos de los mismos, o agonistas del receptor de AII AT.sub.2 tipo 2; compuestos que contienen bismuto (sal de bismuto o complejo de bismuto).

En ciertas formas de realización, los métodos descritos en el presente documento implican la administración de un terapéutico anti-mucositis y un agonista de SAP. Estos agentes terapéuticos se pueden formular para que se administren conjuntamente usando uno o más soportes fisiológicamente aceptables. Estos terapéuticos combinacionales se pueden formular para una variedad de modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada, como se describe en el presente documento para la administración de SAP y agonistas de SAP.

En ciertas formas de realización, el terapéutico anti-mucositis se puede formular para la liberación sostenida de SAP y/o terapéuticos anti-mucositis adicionales. Las formulaciones para la liberación sostenida se pueden administrar usando uno o más soportes fisiológicamente aceptables. Estos terapéuticos de combinación se pueden formular para una variedad de modos de administración, incluyendo administración sistémica y tópica o localizada, como se describe en el presente documento para la administración de SAP y polipéptidos SAP. En ciertas formas de realización, el terapéutico anti-mucositis se puede administrar a un paciente para prevenir o reducir la gravedad de la mucositis oral.

La presente invención proporciona terapéuticos anti-mucositis que comprenden un soporte oralmente aceptable. Como se usa en el presente documento, un "soporte oralmente aceptable" se refiere a un material o combinación de materiales que son seguros para usar en las composiciones de la presente invención, que corresponde a una proporción beneficio/riesgo razonable, con el que el terapéutico anti-mucositis se puede asociar al tiempo que retiene eficacia significativa. Preferiblemente, el soporte no reduce sustancialmente la eficacia del terapéutico anti-mucositis. La selección de los componentes soportes específicos depende de la forma del producto deseada, incluyendo dentífricos, enjuagues, geles y pinturas. En varias formas de realización, el soporte es operable para adherir suficientemente el terapéutico anti-mucositis contra superficies en la cavidad oral a la que la composición se administra, sin el uso concomitante de una cubeta dental, férula, cinta o instrumento similar. En varias formas de realización, el soporte es operable para uso con una cinta, cubeta, férula o instrumento similar. En algunas formas de realización, el terapéutico anti-mucositis incluye polipéptidos SAP en una formulación oralmente aceptable. En algunas formas de realización, el terapéutico anti-mucositis incluye polipéptido SAP y agentes activos adicionales en una formulación oralmente aceptable.

Los materiales entre los que son útiles en soportes incluyen agentes de adhesión, modificadores de viscosidad, diluyentes, tensioactivos, moduladores de espuma, activadores de peróxido, agentes estabilizantes de peróxidos, abrasivos, agentes modificantes de pH, humectantes, agentes de textura, edulcorantes, saborizantes, colorantes, y combinaciones de los mismos. Se entiende que mientras que los atributos generales de cada una de las categorías anteriores de material pueden ser diferentes, puede haber algunos atributos comunes y cualquier material determinado puede servir a múltiples fines en dos o más de tales categorías de materiales. Preferiblemente, tales materiales soporte se seleccionan para compatibilidad con el agente terapéutico anti-mucositis y con otros ingredientes de la composición.

En algunas formas de realización, la administración al mismo tiempo de un polipéptido SAP y un agente adicional, tal como velafermina, palifermina, o un agente antimicrobiano o antifúngico, reduce la dosis terapéutica eficaz del

5 polipéptido SAP y/o el agente adicional comparada con la dosis requerida para un efecto terapéutico cuando se administra solo. En algunas formas de realización, la administración al mismo tiempo reduce además el número de días que el paciente está afectado con mucositis comparado con la administración con un polipéptido SAP o el agente adicional solo. En algunas formas de realización, la administración al mismo tiempo retrasa además el desarrollo de mucositis en un paciente comparado con comparado con la administración con un polipéptido SAP o el agente adicional solo. En algunas formas de realización, la administración al mismo tiempo reduce además la gravedad de la mucositis en un paciente comparado con comparado con la administración con un polipéptido SAP o el agente adicional solo.

10 **Lista de secuencias**

SEQ ID NO: 1 proteína amiloide P sérica humana

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTIPLEKPLQNFTLCFRAYSDLRSAYSLFSYNTQGRDN  
 ELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIKFPAPVHICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGL  
 RQGYFVEAQPKIVLGQEQDSYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPENILSAYQGTP  
 LPANILDWQALNYEIRGYVIKPLVWV

15 SEQ ID NO: 2 proteína amiloide P sérica de Gallus gallus

QEDLYRKVVFVREDPSDAYVLLQVQLERPLLNFTVCLRSYTDLTRPHSLFSYATKAQD  
 NEILLFKPKPGEYRFYVGGKYVTRVPENRGEWEHVCASWESGSGIAEFWLNRPWPR  
 KGLQKGYEVGNEAVVMLGQEQDAYGGGFVYNSFTGEMADVHLWDAGLSPDKMRS  
 AYLALRLPPAPLAWGRLRYEAKGDVVVKPRLREALGA

20 SEQ ID NO: 3 proteína amiloide P sérica de Bos taurus

QTDLRGKVFVFPRESSTDHVTLITKLEKPLKNLTLCLRAYSDLSRGYSLFSYNIHSDKNE  
 LLVFKNGIGEYSLYIGKTKVTRATEKFSPVHICTSWESSTGIAEFWINGKPLVKRGLK  
 QGYAVGAHPKIVLGQEQDSYGGGFQDNQSFVGMGEIGDLYMWDSVLSPEEILLVYQGSSS  
 ISPTILDWQALKYEIKGYVIVKPMVWG

25 SEQ ID NO: 4 proteína amiloide P sérica de Cricetulus migratorius

QTDLTGKVFVFPRESESDYVKLIPRLEKPLENFTLCFRITYTDLSRPHSLFSYNTKNKDNE  
 LLIYKERMGEYGLYIENVGAIVRGVEEFASPVHFCTSWESSSGIADFVWNGIPWVKKGL  
 KKGTYVKTQPSIILGQEQDNYGGGFQDKSQSFVGMGDLNMWDSVLTPEEIKSVYEGS  
 WLEPNILDWRALNYEMSGYAVIRPRVWH

**Ejemplificación**

30 **Ejemplo 1.**

Se evaluó SAP humana (hSAP) en un modelo único de rata de enteropatía inducida por radiación (Hauer-Jensen, 1988). Brevemente, se realizó orquiectomía bilateral en ratas macho y se suturó un bucle del intestino delgado hacia el interior del escroto, produciendo una hernia artificial. El día de estudio 0 se administró una única dosis de 17 Gy de irradiación localizada al pequeño segmento del intestino delgado localizado en el interior del escroto, mientras que el resto del intestino se protegía del daño. A las ratas se les administraron i.p. 480 µg de hSAP (n=15) o vehículo (n=17) inmediatamente después de la irradiación; se administraron dosis posteriores los días 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Las ratas se sacrificaron el día 14, y se procesaron secciones del intestino irradiado y protegido para evaluación histológica. Se usó una puntuación de lesión por radiación histopatológica (RIS) (Hauer-Jensen, 1983) que comprendía 7 parámetros de enteropatía de desarrollo temprano (2 semanas) y tardío (12 semanas-26 semanas) para cuantificar la lesión de radiación. También se realizaron inmunohistoquímica cuantitativa, contenido total de colágeno y RT-PCR.

La tinción de hematoxilina y eosina (H&E) de los intestinos de ratas control sin irradiar, irradiadas tratadas con vehículo y tratadas con hSAP se muestra en la figura 1. Se observaron atipia epitelial con células de la cripta anormalmente orientadas, inflamación mucosa con áreas de úlceras graves, área de superficie de mucosa reducida, y espesamiento de la subserosa significativo en los animales tratados con vehículo. Mientras que el daño en la mucosa y la inflamación eran evidentes en los animales tratados con hSAP, el área de superficie de la mucosa total estaba significativamente conservado (figura 2) y el espesamiento de la subserosa estaba significativamente reducido (figura 3). RIS se redujo en animales tratados con hSAP (figura 4), pero no alcanzó significancia ( $p=0,1$ ). Similarmente, la reducción de la inmunorreactividad del colágeno de tipo III (figura 5) no alcanzó significancia ( $p=0,097$ ).

Se usaron varios parámetros (esclerosis vascular, fibrosis incluyendo depósito de colágeno, congestión linfática e ileítis profunda) para calcular la puntuación de lesión por radiación desarrollada durante periodos intermedios (8 semanas) y tardíos (26 semanas) de enteropatía de radiación. El periodo de recuperación de 14 días utilizado en este estudio actual no permitió la observación de estas lesiones de desarrollo tardío. Se espera que extender el tiempo de recuperación más allá de la fase de lesión aguda aumente el impacto de SAP tanto en RIS como en colágeno de tipo III.

Hauer-Jensen, M., L. Poulakos, et al. (1988). "Effects of accelerated fractionation on radiation injury of the small intestine: a new rat model." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 14(6): 1205-12.

Hauer-Jensen, M., T. Sauer, et al. (1983). "Late changes following single dose roentgen irradiation of rat small intestine." *Acta Radio[ Oncol* 22(4): 299-303.

### Ejemplo 2

Se evaluó SAP humana (hSAP) en un modelo de bolsa de la mejilla en hámster de mucositis oral inducida por radiación (Sonis, 1990). Brevemente, se expusieron hámsteres sirios dorados machos de cinco a seis semanas de edad que pesaban 80-90 gramos a una única dosis de 40 Gy de radiación localizada el día 0. Los animales se anestesiaron con ketamina/xilacina IP, la bolsa yugal izquierda se dio la vuelta, y el resto del cuerpo se protegió con un escudo de plomo. La radiación se generó con una fuente de potencial de 160 kilovoltios a una distancia focal de 21 cm, endurecida con un sistema de filtración A1 de 3,0 mm, y administrada a una velocidad de 1,32 Gy/minuto.

A los hámsteres ( $n=16$ /grupo) se les administró IP vehículo (grupo 1) o hSAP 2 mg/kg (grupo 2) cada dos días empezando 30 minutos antes del tratamiento de radiación durante un total de 7 dosis (dosis final el día 12). Ocho animales adicionales (grupo 3) sirvieron como control coincidentes en edad (sin radiación, sin tratamiento).

La mucositis se evaluó clínicamente empezando el día 6, siguiendo en días alternos hasta el día 28, después semanalmente hasta el sacrificio final el día 45. Los animales se anestesiaron ligeramente con anestésico inhalado, y la bolsa izquierda se dio la vuelta y se fotografió. Al final del estudio, dos observadores sin conocimiento del experimento puntuaron las fotografías usando una escala fotográfica validada (Sonis, 2000). Una puntuación  $\geq 3$  coincide con una puntuación  $\geq 3$  clínicamente significativa del Instituto Nacional del Cáncer o la organización Mundial de la Salud.

Los días 8 y 45, cuatro hámsteres de cada grupo de estudio se sacrificaron y ambas bolsas yugales se cortaron. Los días 16 y 28, cuatro hámsteres de los grupos 1 y 2 se sacrificaron y ambas bolsas yugales se cortaron. Las bolsas se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% y se procesaron para evaluación histológica. Las secciones se tiñeron con H&E para examinar fibrosis en el espacio extracelular. Las secciones se tiñeron con rojo sirio y se analizaron con software de análisis de imágenes para cuantificar el depósito total de colágeno.

Las puntuaciones medias de mucositis con enmascaramiento se presentan en la figura 6. La mucositis alcanzó un pico en los animales tratados con vehículo el día 18, con una puntuación media de 3,3. Tanto el día del efecto pico como la puntuación media del pico en animales tratados con vehículo eran consistentes con los datos históricos en este modelo. hSAP retrasó el inicio de la mucositis y redujo significativamente la puntuación media del pico (2,9). La duración de la mucositis, definida como el porcentaje de días que el animal pasó con puntuación de  $\geq 3$ , se redujo significativamente en animales tratados con hSAP.

Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 69(4):437-43, 1990.

Sonis ST. Animal models of oral mucositis induced by antineoplastic drugs and radiation. In: Teicher B, ed. *Tumor models in cancer research*. Totowa, NJ: Humana Press; 2000.

### Ejemplo 3

Se evaluó SAP humana (hSAP) en un modelo de bolsa de la mejilla en hámster de mucositis oral inducida por radiación para examinar los efectos del programa de dosis y nivel de dosis en la frecuencia, gravedad y duración de la mucositis oral. Siguiendo el mismo protocolo esbozado en el ejemplo 2, se irradiaron hámsteres sirios dorados

machos de cinco a seis semanas de edad el día 0 con 40 Gy de radiación localizada en la bolsa de la mejilla izquierda. A los hámsteres (n=12/grupo) se les administró ip vehículo o hSAP según la siguiente tabla 1:

Tabla 1

| Número del grupo | Tratamiento        | Programa   |
|------------------|--------------------|--|
| 1                | PBS, ip            | Días 0, 2, 4, 6, 8, 10 & 12                              |
| 2                | hSAP, ip, 2 mg/kg  | Días -1, 0, 2, 4, 6, 8, 10 & 12, 16, 18, 20, 22, 24 & 26 |
| 3                | hSAP, ip, 2 mg/kg  | Días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 & 7                             |
| 4                | hSAP, ip, 2 mg/kg  | Días 0, 2, 4, 6, 8, 10 & 12                              |
| 5                | hSAP, ip, 10 mg/kg | Días 0, 2, 4, 6, 8, 10 & 12                              |

El día 0 la dosis se administró 30 minutos antes de la radiación. La mucositis se puntuó en días alternos empezando el día 6, y siguiendo hasta el día 28, anestesiando los animales con un anestésico por inhalación y dando la vuelta a la bolsa de la mejilla. La mucositis se evaluó visualmente por comparación con una escala fotográfica validada, que varía desde 0 para normal, hasta 5 para úlceras graves.

Las puntuaciones medias de mucositis con enmascaramiento se presentan en la figura 7. La mucositis alcanzó un máximo en el grupo tratado con vehículo el día 14, con una puntuación media de 3,5. Los grupos tratados con hSAP tuvieron un pico de mucositis retrasado y disminuido. También se evaluaron los efectos del tratamiento sobre la mucositis calculando el número de días con una puntuación de mucositis de 3 o mayor. El análisis por chi cuadrado de estos datos mostró que el porcentaje de días con una puntuación de 3 o mayor estaba significativamente reducida en todos los grupos tratados con hSAP (tabla 2).

Tabla 2

| Número del grupo | % de días con puntuación de mucositis $\geq 3$ | valor de P |
|------------------|--|------------|
| 1                | 49,2   | -          |
| 2                | 36,7   | 0,007      |
| 3                | 36,7   | 0,007      |
| 4                | 39,2   | 0,035      |
| 5                | 34,9   | 0,003      |

Se realizó un análisis adicional de las puntuaciones de mucositis usando el análisis del orden de Mann-Whitney para comparar cada grupo de tratamiento de hSAP con el grupo control vehículo. En este análisis, generalmente se requieren dos días de reducción significativa en la puntuación de mucositis antes de que se considere significativo. Las puntuaciones de mucositis se redujeron significativamente en al menos 4 días en todos los grupos de tratamiento con hSAP relativo al grupo control vehículo (tabla 3, diferencias significativas identificadas en negrita).

Tabla 3

| Número de grupo | Día de estudio |              |              |       |                  |              |       |       |       |              |                  |                  |
|-----------------|----------------|--------------|--------------|-------|------------------|--------------|-------|-------|-------|--------------|------------------|------------------|
|                 | 6              | 8            | 10           | 12    | 14               | 16           | 18    | 20    | 22    | 24           | 26               | 28               |
| 2               | 0,217          | <b>0,018</b> | <b>0,039</b> | 0,252 | 0,056            | 0,101        | 0,297 | 0,297 | 0,232 | 0,299        | <b>0,030</b>     | <b>0,029</b>     |
| 3               | 0,626          | 0,374        | 0,934        | 0,403 | <b>0,026</b>     | 0,269        | 0,135 | 0,280 | 0,061 | <b>0,002</b> | <b>&lt;0,001</b> | <b>&lt;0,001</b> |
| 4               | 0,217          | <b>0,021</b> | <b>0,006</b> | 0,287 | <b>0,003</b>     | <b>0,048</b> | 0,230 | 0,116 | 0,072 | 0,461        | <b>0,030</b>     | <b>0,003</b>     |
| 5               | 0,138          | <b>0,010</b> | 0,061        | 0,285 | <b>&lt;0,001</b> | 0,149        | 0,138 | 0,250 | 0,137 | 0,518        | <b>0,021</b>     | <b>0,006</b>     |

En conclusión, todos los grupos de tratamiento de hSAP tuvieron reducciones significativas en el número de días con una puntuación de mucositis de 3 o mayor cuando se comparan con los controles de vehículo. El grupo 5 (hSAP 10 mg/kg los días 0-12, c2d) tuvo el menor número de días con una puntuación de mucositis de tres o más (76 días comparado con 118 días en el grupo tratado con vehículo, p=0,003). El grupo 4 (hSAP 2 mg/kg los días 0-12, c2d) mostró la mayor reducción global en puntuaciones de mucositis diarias determinadas usando la prueba de orden de Mann-Whitney.

#### Ejemplo 4

Se evaluaron los efectos de la administración intravenosa e intraperitoneal de hSAP en un tercer estudio de mucositis oral inducida por radiación. Se compararon hámsteres en los grupos de dosis intravenosa con catéteres yugulares quirúrgicamente implantados. Siguiendo el mismo procedimiento esbozado en el ejemplo 2, se irradiaron hámsteres sirios dorados de cinco a seis semanas de edad el día 0 con 40 Gy de radiación localizada a la bolsa de la mejilla izquierda. Se administró a los hámsteres (n=12/grupo) vehículo o hSAP según la siguiente tabla 4.

Tabla 4

| Número de grupo | Tratamiento         | Programa                     |
|-----------------|---------------------|------------------------------|
| 1               | PBS, iv             | Días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 & 7 |
| 2               | hSAP, ip, 2 mg/kg   | Días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 & 7 |
| 3               | hSAP, iv, 0,5 mg/kg | Días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 & 7 |

|   |                   |                              |
|---|-------------------|------------------------------|
| 4 | hSAP, ip, 2 mg/kg | Días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 & 7 |
|---|-------------------|------------------------------|

5 La dosis del día 0 se administró 30 minutos antes de la radiación. La mucositis se puntuó cada dos días empezando el día 6, y siguiendo hasta el día 28, anestesiando los animales con un anestésico por inhalación y dando la vuelta a la bolsa de la mejilla. La mucositis se evaluó visualmente por comparación con una escala fotográfica validada, que varía desde 0 para normal, hasta 5 para úlceras graves.

10 Las puntuaciones medias de mucositis con enmascaramiento se presentan en la figura 8. La mucositis alcanzó un máximo en el grupo tratado con vehículo el día 18, con una puntuación media de 3,8. La puntuación de mucositis en el pico se redujo en todos los grupos de tratamiento de hSAP, aunque el día del efecto pico no cambió. También se evaluaron los efectos del tratamiento sobre la mucositis calculando el número de días con una puntuación de mucositis de 3 o mayor. El análisis por chi cuadrado de estos datos mostró que el porcentaje de días con una puntuación de 3 o mayor estaba significativamente reducida en los animales tratados con hSAP ip, pero no estaba significativamente reducida en animales tratados con hSAP iv (tabla 5).

15 Tabla 5

| Número del grupo | % de días con puntuación de mucositis $\geq 3$ | valor de P |
|------------------|--|------------|
| 1                | 57,1   | -          |
| 2                | 43,3   | 0,008      |
| 3                | 50,0   | 0,204      |
| 4                | 46,8   | 0,056      |

20 Se realizó un análisis adicional de las puntuaciones de mucositis usando el análisis del orden de Mann-Whitney para comparar cada grupo de tratamiento de hSAP respecto al grupo control de vehículo. En este análisis, generalmente se requieren dos días de reducción significativa en la puntuación de mucositis antes de que se considere significativo. Las puntuaciones de mucositis se redujeron significativamente en todos los grupos tratados con hSAP relativo al grupo control vehículo (tabla 6, diferencias significativas identificadas en negrita).

Tabla 6

| Número del grupo | Día de estudio |       |              |                  |              |       |                  |              |       |              |       |              |
|------------------|----------------|-------|--------------|------------------|--------------|-------|------------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|
|                  | 6              | 8     | 10           | 12               | 14           | 16    | 18               | 20           | 22    | 24           | 26    | 28           |
| 2                | 0,512          | 0,512 | 0,061        | 0,154            | 0,353        | 0,273 | <b>&lt;0,001</b> | <b>0,026</b> | 0,096 | <b>0,006</b> | 0,066 | <b>0,017</b> |
| 3                | 0,541          | 0,541 | <b>0,023</b> | <b>0,006</b>     | 0,561        | 0,456 | 0,141            | 0,592        | 0,720 | 0,270        | 0,468 | 0,066        |
| 4                | 0,520          | 0,059 | <b>0,005</b> | <b>&lt;0,001</b> | <b>0,006</b> | 0,492 | <b>0,002</b>     | <b>0,026</b> | 0,981 | 0,588        | 0,726 | 0,236        |

25 En conclusión, los hámsteres tratados con hSAP 2 mg/kg, ip no tuvieron reducciones significativas en el número de días con una puntuación de mucositis de 3 o mayor cuando se compara con controles de vehículo ( $p=0,008$ ). Este grupo mostró mejoras estadísticamente significativas relativas a los controles tratados con vehículo los días 18, 20, 24 y 28. Los hámsteres con catéteres implantados (grupos 1, 3 & 4) tuvieron signos de infección en los sitios del catéter, lo que puede haber influido en la resolución de la mucositis. Los hámsteres tratados con hSAP iv no mostraron una mejora en el número de días con una puntuación de mucositis de 3 o mayor, pero los grupos mostraron mejoras significativas relativas a los controles tratados con vehículo en varios días de estudio.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido amiloide P sérico (SAP) para uso en tratar, prevenir, o reducir la gravedad de mucositis o un trastorno relacionado con mucositis en un paciente.
2. Uso de un polipéptido SAP en la preparación de un medicamento para tratar, prevenir o reducir la gravedad de mucositis o un trastorno relacionado con mucositis en un paciente.
- 10 3. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 1, o el uso de la reivindicación 2, en donde la mucositis o trastorno relacionado con mucositis se selecciona de mucositis gastrointestinal, mucositis oral, mucositis alimentaria, mucositis esofágica, úlceras gástricas, úlceras duodenales, erosiones del estómago y esófago, colitis, reflujo gastroesofágico, y enfermedad intestinal inflamatoria.
- 15 4. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 1 o 3, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en donde la mucositis se asocia con tratamiento de radiación, quimioterapia, o una combinación de los mismos.
- 20 5. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde el paciente está en riesgo de desarrollar mucositis.
- 25 6. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 5, o el uso de la reivindicación 5, en donde el polipéptido SAP es para administración antes de, al mismo tiempo que, o después de un tratamiento que coloca al paciente en riesgo de desarrollar mucositis.
- 30 7. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 6, o el uso de la reivindicación 6, en donde el tratamiento que coloca al paciente en riesgo de desarrollar mucositis comprende terapia de radiación, quimioterapia o una combinación de las mismas.
- 35 8. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 6 o 7, o el uso de la reivindicación 6 o 7, en donde el polipéptido SAP es para tratar mucositis o un trastorno relacionado con mucositis en un paciente que está siendo tratado contra el cáncer.
9. El polipéptido SAP para uso según la reivindicación 8, o el uso de la reivindicación 8, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de cabeza, cuello, mama, pulmón, ovario, próstata, linfático, leucémico o gastrointestinal.
- 40 10. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- 45 11. El uso de la reivindicación 2, en donde el medicamento contiene además un factor de crecimiento seleccionado del velfermina o palifermina.
12. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 97% idéntica a SEQ ID NO: 1.
- 50 13. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el polipéptido SAP comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 99% idéntica a SEQ ID NO: 1.
14. El polipéptido SAP para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3-9, o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde el polipéptido SAP comprende cinco polipéptidos de SEQ ID NO: 1.

Figura 1A – Control no irradiado

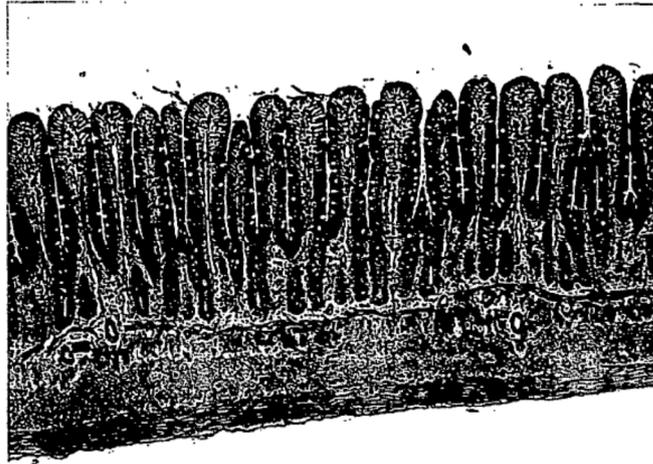
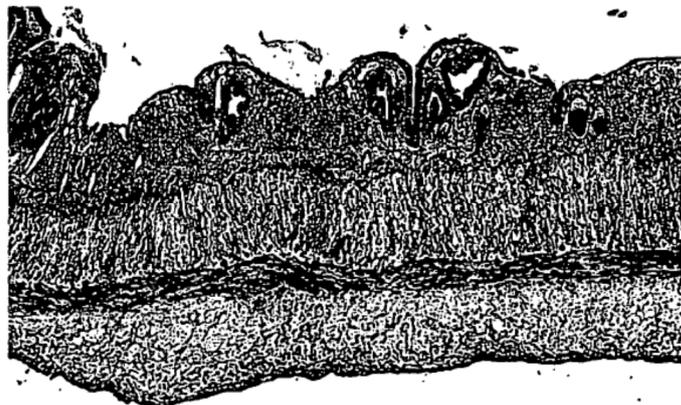


Figura 1B – Irradiado + Vehículo



**Figura 1C – Irradiado + hSAP**

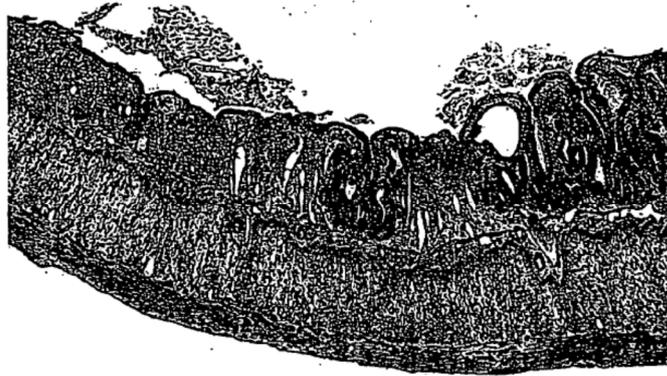


Figura 2

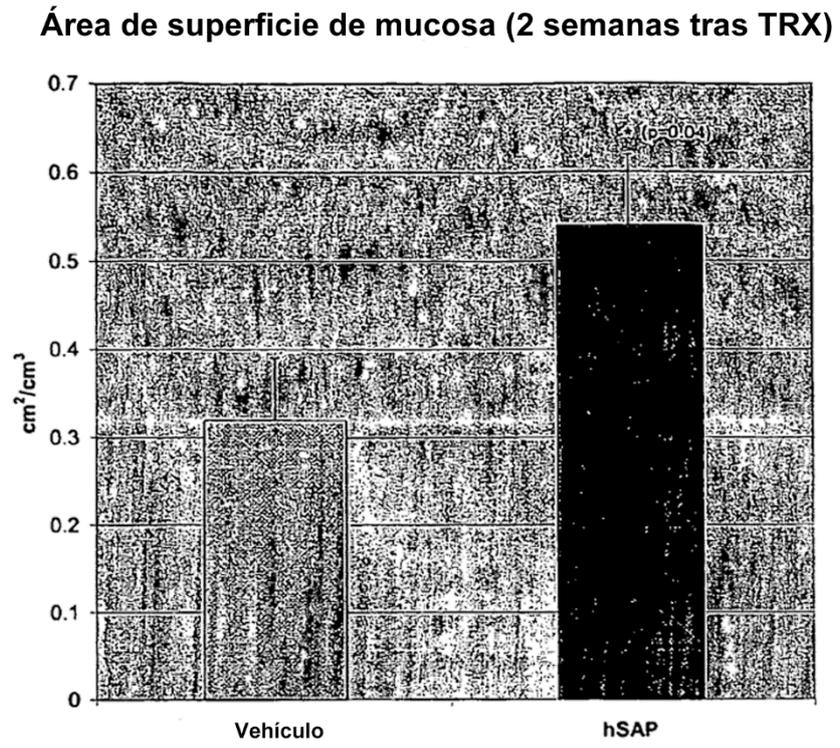


Figura 3

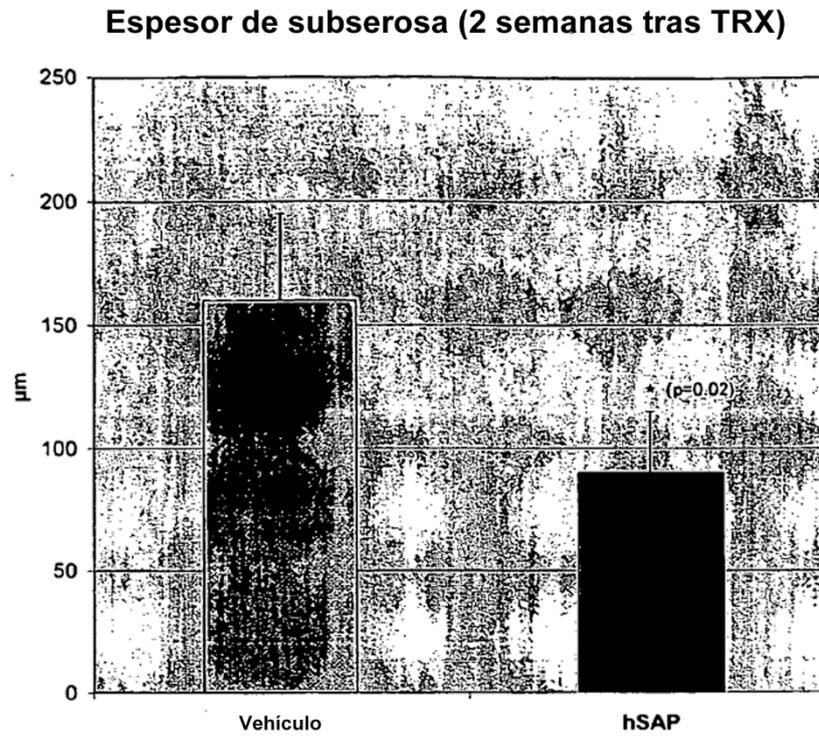


Figura 4

Puntuación de lesión por radiación (2 semanas tras TRX)

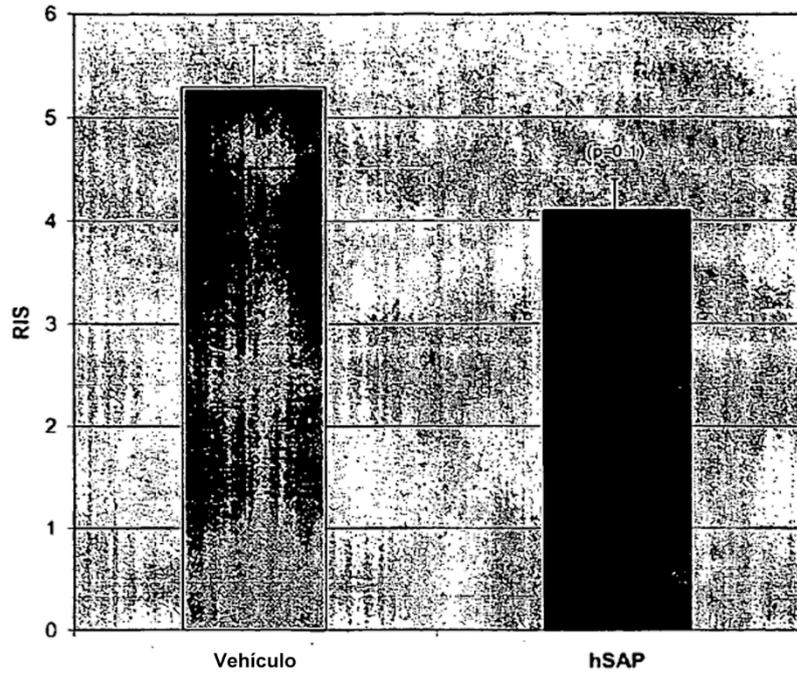


Figura 5

Inmunorreactividad de colágeno tipo III (2 semanas tras TRX)

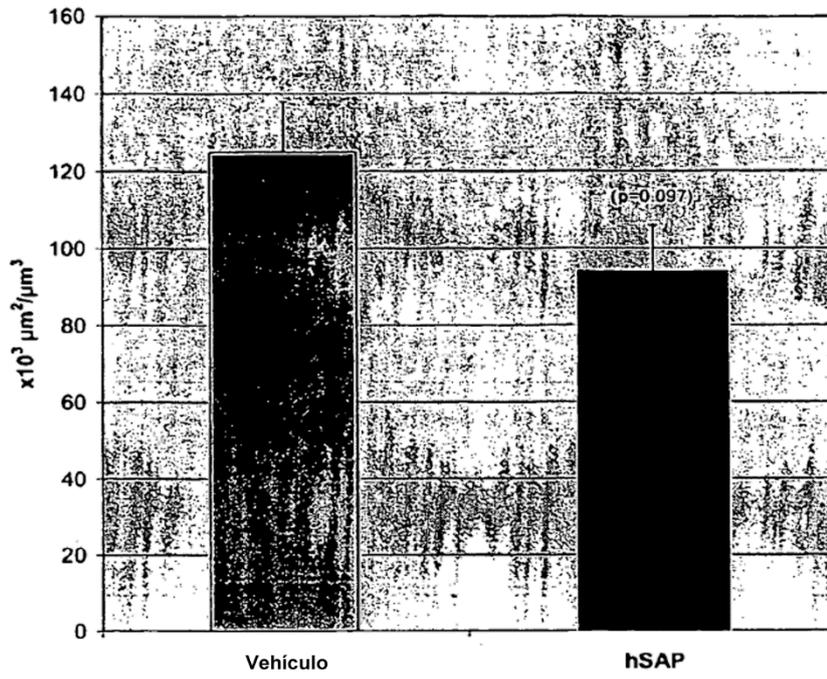


Figura 6

PRM-01 Puntuaciones de mucositis con enmascaramiento

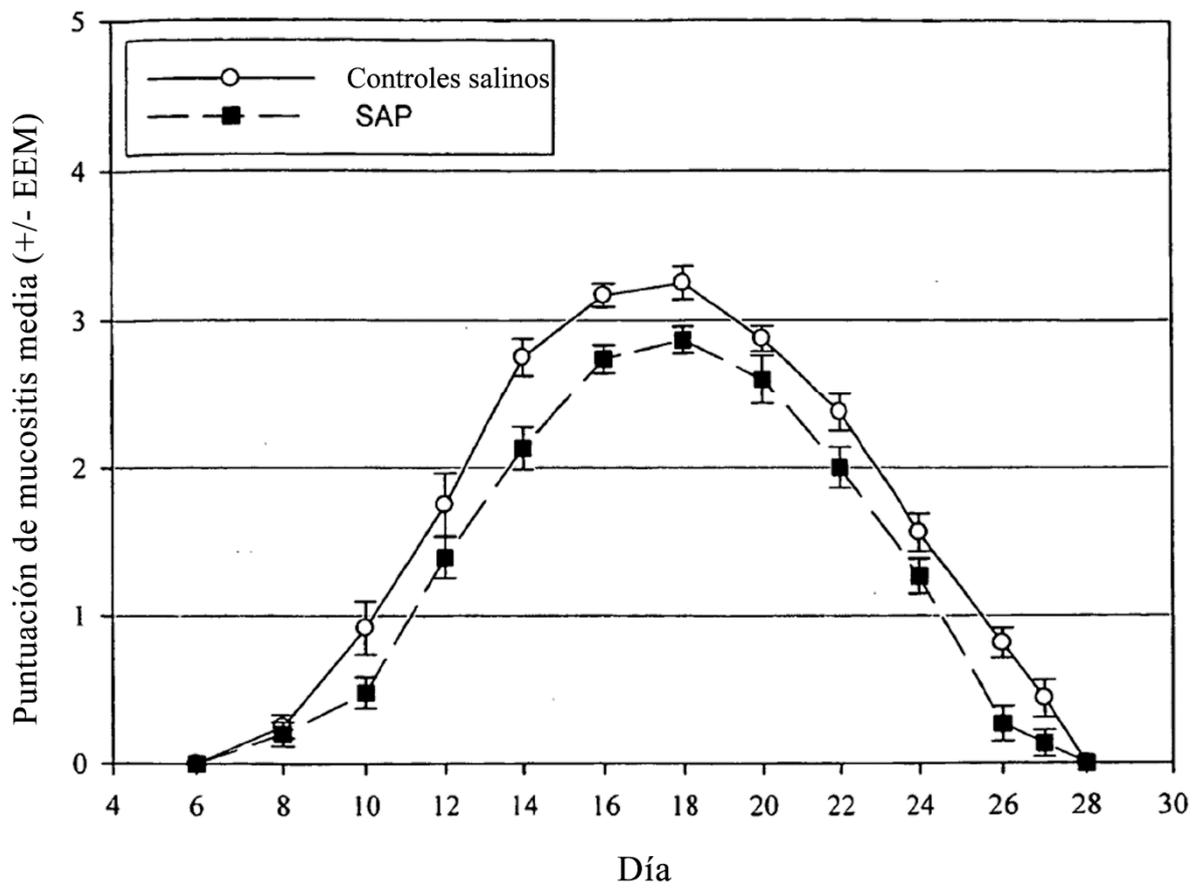


Figura 7

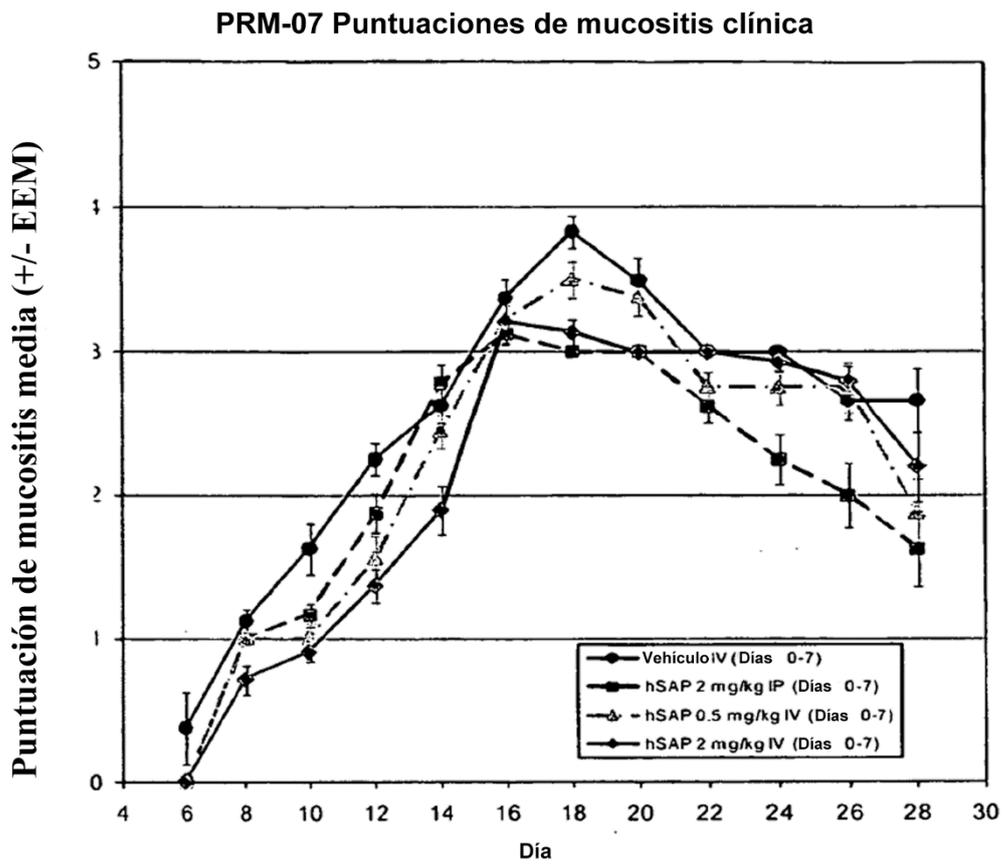


Figura 8

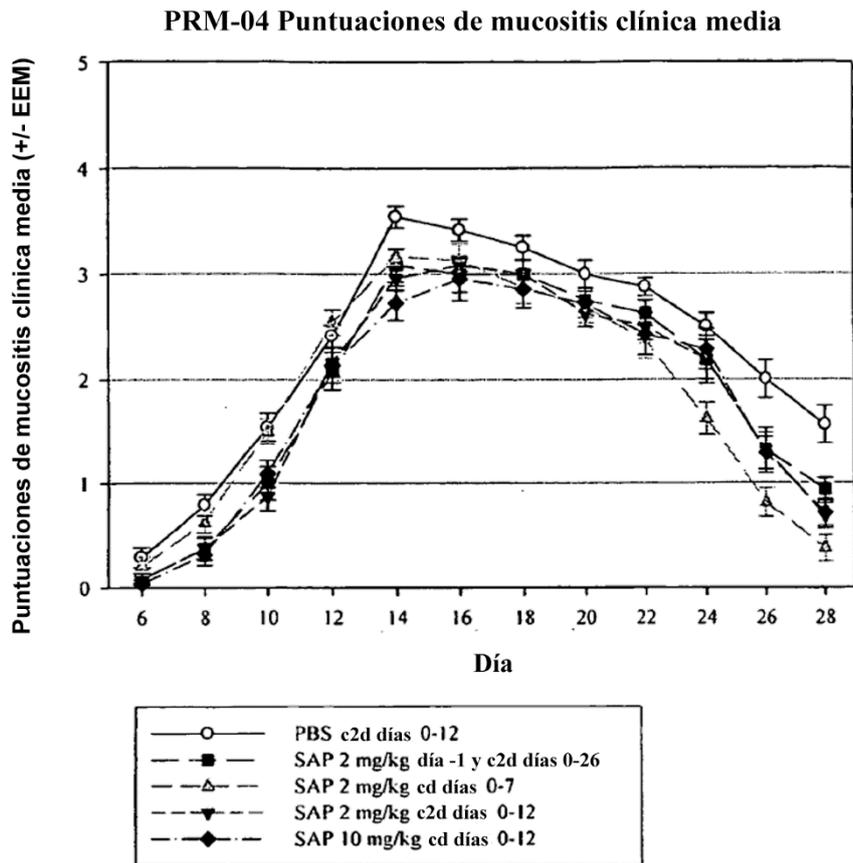


Figura 9

|                |   |
|----------------|---|
| Homo sapiens   | H T D L S G K I V F V F P R E S V I T D H V N L I T P L E K P L       |
| Gallus gallus  | Q E I D I Y R K V F V F R E D P S D A Y W L E Q V Q L E R P L         |
| Bos taurus     | Q T D L R G K I V F V F P R E S S T D H V T L I T K L E K P L         |
| C. migratorius | Q T D L T G K V F V F P R E S S E S D Y V K L I P R L E K P L         |
|                |   |
| Homo sapiens   | Q N F I T L C E P R A Y S D L S R A Y S L F S V A N T Q C R D N E     |
| Gallus gallus  | L N F T V C L R S Y T D L T R P H S L F S Y A T K A Q D N E           |
| Bos taurus     | K N L L L G L R A V S D L S R G Y S L F S Y N I H S K D N E           |
| C. migratorius | E N F T L C P A T Y T D L S R P H S L F S Y N T K N K D N E           |
|                |   |
| Homo sapiens   | L L V Y K E E R W G D A V S L V P I G R R H K V T P S K V S E K F P A |
| Gallus gallus  | I L L F K P K P C E Y R F V V G K Y V T F R V P P N R G E             |
| Bos taurus     | L D V F K N G I G E Y S L V N G K T K W L V R A T E K F P S           |
| C. migratorius | L L I Y K E R M C E Y G L Y I E N V G A I V R G V E E F A S           |
|                |   |
| Homo sapiens   | P V H T C V S W E S S S G I A R E F A W T N G T P L W R K G L R       |
| Gallus gallus  | W E H V C A S W E S S G S I G P A E F W L N G R P W P R K G L Q       |
| Bos taurus     | P V H T C T S W E S S T G I A E F W T N G K P L V R K R G L K         |
| C. migratorius | P V H F C T S W E S S S G I A D F W V N G I P W V R K K G L K         |
|                |   |
| Homo sapiens   | Q G Y E V A K O P K R I V I G O F O D S Y G G K E D R S Q S F         |
| Gallus gallus  | K G Y E V G N E A V V M L G O F O D A Y G G G F D V Y N S F           |
| Bos taurus     | Q G Y A V G A H P K S V E I G O F O D S Y G G G F D K N Q S F         |
| C. migratorius | K G Y T V K T O P S I L G O F O D N V G G G F D K S O S F             |
|                |   |
| Homo sapiens   | V G E I G D L Y M W D S V L P P E N I Y L S A Y Q C T P L P A         |
| Gallus gallus  | T G E M A D V H L W D A G L S P D K M R S A Y L A L R L P P           |
| Bos taurus     | M G E I G D L Y M W D S V L S P E E I L L V Y Q G S S S I S           |
| C. migratorius | V G E M G D L N M W D S V L T P E E I K S V Y E G S W L E P           |
|                |   |
| Homo sapiens   | N I L D W Q A L N Y E I R G Y V I I K P L V W V                       |
| Gallus gallus  | A P L A W G R L R Y E A K C D V V V K P R L R E A L G A               |
| Bos taurus     | P T I L D W Q A L K Y E I K G Y V I V K P M V W G                     |
| C. migratorius | N I L D W R A L N Y E M S G Y A V I R P R V W H                       |