

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 538**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2010** **E 10002990 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2368564**

54 Título: **Composición farmacéutica que contiene SAA para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas agudas y crónicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2016

73 Titular/es:

LINKE, REINHOLD PAUL (100.0%)
Vinzenz-Schüpfstrasse 20a
81475 München, DE

72 Inventor/es:

SANDER, LEIF ERIK;
TRAUTWEIN, CHRISTIAN y
LINKE, REINHOLD PAUL

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 560 538 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

Composición farmacéutica que contiene SAA para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas agudas y crónicas

5 La presente invención describe una novedosa estrategia de intervención para el tratamiento de inflamaciones desreguladas usando proteínas de fase aguda hepáticas amiloide A de suero (SAA). La dicha proteína se va a usar como composiciones farmacéuticas en el tratamiento de afecciones y enfermedades caracterizadas por inflamaciones desreguladas. Además de efectos antiinflamatorios directos, así como defensivos del huésped, se descubre una regulación hasta ahora no reconocida de células supresoras de origen mieloide (MDSC). Las células supresoras de origen mieloide parecen ser reguladores clave de las respuestas inflamatorias durante la septicemia y por tanto representan una diana valiosa para el tratamiento de estos trastornos. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz del agente anteriormente identificado para el tratamiento de septicemia.

Antecedentes y estado de la técnica

La inflamación desregulada es una causa común de varias afecciones médicas que van desde enfermedades autoinflamatorias como EII o artritis reumatoide (AR) a lesión (politraumática) y septicemia.

Síndromes y afecciones inflamatorias agudas

La septicemia es una causa principal de mortalidad en el mundo caracterizada por una respuesta inflamatoria incontrolada a infecciones. Desafortunadamente, las estrategias terapéuticas que se dirigen a citoquinas proinflamatorias solo han tenido un éxito muy limitado, lo que demuestra la compleja patogénesis de los trastornos que están determinados por una variedad tanto de patógeno como factores huéspedes.

La activación incontrolada del sistema inmunitario puede producir un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). El SRIS está causado lo más frecuentemente por infecciones en el curso de septicemia; las causas no infecciosas del SRIS incluyen traumatismo, quemaduras, pancreatitis, isquemia y hemorragia. Las complicaciones comunes del SRIS incluyen insuficiencia de uno o más órganos o sistemas de órganos, por ejemplo, lesión renal aguda, lesión pulmonar aguda como síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), o síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO).

Una complicación principal de la septicemia y SRIS es el desarrollo de choque séptico y posterior insuficiencia de sistemas multiorgánicos (SDMO) o síndrome de insuficiencia multiorgánica (SIMO) y está asociada con un mal desenlace y alta mortalidad. De hecho, la septicemia y sus complicaciones representan la causa principal de mortalidad en pacientes de cuidados intensivos. Se ha descrito una tasa de mortalidad del 20% de pacientes con septicemia grave y del 46% de pacientes con choque séptico.

Una definición de SRIS, septicemia e insuficiencia orgánica, etc., así como directrices para el uso de terapias innovadoras en septicemia se esbozan en Bone, R.C. et.al., Chest 1992, 101, 1644-1655. Además, este documento proporciona directrices para determinar septicemia etc., basado en diferentes parámetros como temperatura, la frecuencia cardíaca, etc.

El tratamiento de septicemia y SRIS se basa principalmente en la administración de antibióticos, sustitución de líquido, drenaje quirúrgico de recogidas de líquidos infecciosos, y apoyo apropiado para la disfunción orgánica. Sin embargo, las respuestas inflamatorias desreguladas más que el agente infeccioso o el traumatismo mismo es con frecuencia la causa de complicaciones graves a las que no se dirigen suficientemente las estrategias terapéuticas generales esbozadas anteriormente. Por tanto, se han hecho esfuerzos significativos para inhibir los mediadores clave de la inflamación, con todo, la mayoría de los estudios dio resultados bastante desalentadores. Por tanto, hay una necesidad urgente para estrategias antiinflamatorias alternativas.

Afecciones inflamatorias crónicas

Las enfermedades caracterizadas por inflamación crónica incluyen enfermedades autoinflamatorias y autoinmunitarias como enfermedad intestinal inflamatoria (EII), AR (artritis reumatoide) o psoriasis. Aquí la activación crónica de células inmunitarias dirige la destrucción de tejidos, que puede seguir a una pérdida de funciones de órganos y complicaciones graves tal como constricciones intestinales, destrucción de articulaciones y malformaciones. Además, el daño de órganos inflamatorio crónico se considera un factor principal que contribuye al desarrollo del cáncer y cirrosis hepática.

Proteínas de fase aguda

Las proteínas de fase aguda (PFA) son una familia de proteínas evolutivamente conservada producidas principalmente en el hígado en respuesta a infecciones e inflamaciones. Se definen como proteínas cuyos niveles en

suero cambian en más del 25% durante la inflamación. Algunas PFA aumentan (PFA positivas) y otras disminuyen (PFA negativas). Las PFA positivas (en lo siguiente denominadas PFA) principalmente se sintetizan en el hígado y se consideran como componentes importantes de la respuesta inmunitaria innata a la infección. Muchas PFA se conocen como potentes opsoninas y activadores de células inmunitarias innatas como neutrófilos, pero también tienen alguna propiedad antiinflamatoria. Debido a la gran diversidad de PFA con función pro- y antiinflamatoria su papel global durante las infecciones aún no está bien definido.

La interleuquina-6 (IL-6) es uno de los inductores principales de la producción de PFA en hepatocitos in vitro. IL-6 comparte el receptor de señalización común gp130 con otras ocho citoquinas. La activación de las células inmunitarias innatas es crítica para la defensa del huésped contra los microorganismos invasores y para la posterior generación de una respuesta inmunitaria adaptativa. Por otra parte, los mediadores proinflamatorios producidos por las células inmunitarias innatas se consideran elementos clave en la patogénesis de septicemia grave e insuficiencia multiorgánica. Una red compleja de funciones activadoras e inhibidoras que conduce a rutas reguladoras controla las respuestas inmunitarias innatas. Se sabe que IL-6 también representa uno de los principales mediadores proinflamatorios y de septicemia es un estimulador fuerte de la producción de PFA en el hígado in vivo. Notablemente, los pacientes con enfermedades hepáticas crónicas tienen un riesgo significativamente aumentado de adquirir septicemia y sus complicaciones acompañantes, y, por tanto, tienen mayor mortalidad relacionada con septicemia. Los pacientes sépticos con enfermedad hepática crónica muestran inflamación exacerbada prolongada y niveles elevados de citoquinas inflamatorias.

Como se ha mencionado anteriormente, las PFA forman un gran grupo de proteínas con funciones muy diversas. Las PFA incluyen moléculas tales como CRP (proteína reactiva C) y SAA (amiloide A de suero).

CRP es un marcador de respuesta de fase aguda clínica y PFA usada comúnmente en pacientes. Se ha mostrado que sus niveles en suero se correlacionan bien con respuestas inflamatorias sistémicas o locales. Se ha mostrado que CRP se une a residuos de fosfocolina expresados en la superficie de células muertas o que se mueren, así como en algunas bacterias, lo que produce la activación del sistema del complemento. La activación del complemento constituye un mecanismo de defensa innato principal contra invasores bacterianos. CRP se produce en el hígado por hepatocitos en respuesta a la activación de gp130 por IL-6 u otras citoquinas de la familia de IL-6.

La proteína amiloide A de suero (SAA) constituye una familia de apolipoproteínas multigénica muy conservada que consiste en cuatro genes en seres humanos de los solo tres se expresan, siendo SAA3 un pseudogén. SAA1 y SAA2 comprenden las SAA de fase aguda (A-SAA) que están químicamente muy relacionadas con menos del 10% de diferencia de la secuencia de aminoácidos mientras que SSA4 se diferencia en el 47% y el 45% de SAA1 y SAA2, respectivamente. Además, se conocen alotipos de A-SAA (SAA1.1-5 y SAA2.1-2). Puesto que SAA4 no muestra el comportamiento de fase aguda llamativo se llama SAA constitutiva (C-SAA) y su función se desconoce en gran parte. Las A-SAA tienen 104 aminoácidos mientras que C-SAA tiene 112 aminoácidos (NM 199161). El mayor tamaño de la última se debe a una inserción de un octapéptido entre el residuo 69 y 70 cuya función es desconocida. Todas las moléculas de SAA en todas las especies analizadas hasta ahora comparten un péptido invariable en la posición 33-43 que se ha mostrado que lleva funciones de SAA principales al ser bloqueado mediante anticuerpos monoclonales dirigidos contra este péptido. Además con este péptido invariable se ha advertido el tripéptido RGN. Se parece al motivo de unión celular RGD de fibronectina que es una de las proteínas adhesivas celulares en la matriz extracelular y que también puede permitir a las células neoplásicas migrar y construir metástasis en el tejido conjuntivo que muestra estos motivos de unión celular. Además, el péptido YIGSD (Seq. ID. No. 1) en la posición 29-33 solo en SAA1 se parece al motivo adhesivo celular YIGSR (Seq. ID. No. 2) de la proteína de matriz extracelular laminina. Ambos motivos en SAA pueden contrarrestar la migración de células metastásicas compitiendo con motivos similares en fibronectina y laminina (como ejemplos de familias de células que tienen funciones similares) en varios tejidos conjuntivos. SAA también puede volverse patogénica después de varias reacciones de fase aguda duraderas por polimerización a amiloide del fragmento 1-76 de SAA1/2 que produce la enfermedad letal amiloidosis AA.

SAA se ha asociado con un número de afecciones inflamatorias agudas y crónicas independientemente del origen. En respuesta a estímulos inflamatorios agudos, que en particular están representados por la IL-1 derivada de monocitos, IL6, y TNF α , los niveles en plasma de SAA1 y SAA2 pueden aumentar rápidamente más de 1.000 veces en 6 a 12 horas.

CXCL1 (NM 001511, Seq ID. No. 3) es una pequeña citoquina que pertenece a la familia de quimioquinas Cxc. CXCL1 desempeña un papel en el desarrollo de la médula espinal y está implicada en los procesos de angiogénesis, inflamación, cicatrización y tumorigénesis. Se conoce principalmente por su papel en reclutar leucocitos polimorfonucleares al sitio de inflamación a través de su actividad quimiotáctica directa. CXCL1 ejerce sus funciones a través del receptor de quimioquinas CXCR2.

De forma interesante, se ha mostrado que ambas proteínas, SAA y KC son potentes inhibidores de hepatitis inducida por Con A (Klein et al., 2005).

Además, se ha mostrado que la administración de SAA y KC invierte los efectos perjudiciales de la deficiencia de gp130 y restablece la movilización, supervivencia y acumulación esplénica de MDSC (Sander et al., 2009).

5 Dado el gran número y la gran diversidad de PFA tanto con funciones pro- como antiinflamatorias, su papel global durante las enfermedades inflamatorias desreguladas, por ejemplo, septicemia, permanece aún mal definida.

Células supresoras de origen mieloide (MDSC)

10 Las células supresoras de origen mieloide (MDSC) representan una población inmadura, heterogénea de células (precursoras) mieloides que se caracterizan comúnmente por la expresión de marcadores de linaje mieloide Gr1 y CD11b en ratones y se sabe que inhiben las respuestas T efectoras. Las células mieloides con funciones antiinflamatorias se han reconocido en ratones que tienen tumores durante mucho tiempo (Young et al., 1987), pero su significación funcional para la evasión inmunitaria tumoral, angiogénesis y metástasis solo se ha apreciado más ampliamente recientemente (Nagaraj et al., 2007; Yang et al., 2008). Las MDSC también se han implicado en otros estados patológicos como autoinmunidad. Se ha descrito la expansión de MDSC con propiedades supresoras de células T durante la septicemia en ratones (Delano et al., 2007). A diferencia de muchos cánceres, su contribución a la progresión de la enfermedad y supervivencia del huésped durante las infecciones aún está indefinida.

20 De forma interesante, también se ha mostrado que las MDSC desempeñan un papel protector en modelos de enfermedades autoinflamatorias como EII (Haile et al., 2008). De forma importante su presencia también se ha demostrado en seres humanos (Hoechst et al., 2008).

25 Como se ha mencionado anteriormente, las MDSC tienen funciones protumorigénicas y la inhibición de MDSC se considera una estrategia terapéutica futura prometedora (Gabrilovich y Nagaraj, 2009). En seres humanos las MDSC se han caracterizado por varios marcadores de superficie incluyendo CD34, CD33, CD15 y CD13, CD14-/lin- o CD11b, CD66, VEGFR.

30 Hay una necesidad no cumplida para agentes terapéuticos para tratar enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas, en particular septicemia y SRIS. Además, la evasión inmunitaria por cánceres representa un problema principal, que se podría atacar a través de los mismos mecanismos que controlan la inflamación durante la septicemia y SRIS.

Compendio de la presente invención

35 Usando un ratón deficiente en gp130 específico de hígado, se demuestra que SAA y CXL1/KC derivadas de hepatocitos son reguladores cruciales de la inflamación innata durante la septicemia polimicrobiana en ratones. Empleando experimentos de pérdida complementaria y ganancia de función se proporciona evidencia clara para el papel protector de SAA durante la septicemia controlando la inflamación y fomentando la supervivencia, sin afectar a la depuración bacteriana. Por tanto, se ha delineado un mecanismo principal de protección mediada por SAA y KC derivadas de hígado como se describe en mayor detalle en la sección relevante posteriormente.

40 Además, se descubre que la quimioquina CXCL1/GRO1 (KC en ratones) está fuertemente aumentada en hepatocitos de una manera dependiente de gp130 durante la septicemia polimicrobiana en ratones, lo que se correlaciona con sus niveles en suero.

45 La presente invención proporciona una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de inflamación desregulada, en particular, inflamación incontrolada aguda durante septicemia, septicemia grave, choque séptico y SRIS. La presente invención propone el uso de proteínas recombinantes o sus motivos biológicamente activos en cantidades eficaces de SAA o, como referencia, CXCL1/GRO1 para controlar inflamación desregulada y prevenir posterior daño a órganos o la muerte. La administración de estos compuestos fomenta activamente la función de MDSC.

50 Es decir, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un principio activo, en donde el principio activo es una cantidad eficaz de SAA sola o un fragmento activo de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas influyendo la actividad de células supresoras de origen mieloide (MDSC), en donde las enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas son enfermedades autoinflamatorias o enfermedades autoinmunitarias con componentes autoinmunitarios o enfermedades autoinmunitarias incluyendo EII, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, rechazo a trasplantes, enfermedad del injerto contra el huésped y del huésped contra el injerto, enfermedades inflamatorias locales y sistémicas, un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, septicemia grave, choque séptico, síndrome de disfunción multiorgánica, síndrome de insuficiencia de múltiples órganos y rechazo a trasplante agudo.

65 Preferiblemente, dichas enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas son SRIS, septicemia, septicemia grave, choque séptico, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO), SIMO o rechazo a trasplante agudo.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un principio activo, en donde el principio activo es una cantidad eficaz de SAA sola o fragmento activo de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en la reducción, mejora o terminación de respuestas inflamatorias o ralentización de la propagación o intensificación adicional de inflamación o una enfermedad asociada con enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas aumentando la actividad de MDSC.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, en donde el principio activo es un péptido invariable en la posición 33-43 de SAA.

También se prefiere que la composición farmacéutica comprenda además aditivos o sustancias auxiliares farmacéuticas y, preferiblemente, un soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de SAA sola o fragmentos activos de la misma o sales farmacéuticamente aceptables de la misma para uso en el tratamiento de septicemia.

Por último, se contemplan compuestos como los descritos en el presente documento para uso en tratar enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. La señalización gp130/Stat3 en hepatocitos es protectora durante la septicemia polimicrobiana y modera la respuesta inflamatoria.

(A) Supervivencia disminuida de ratones *gp130Δhepa* después de CLP (n = 45 por grupo, datos reunidos de 6 experimentos independientes). (B) El reclutamiento de células inmunitarias a la cavidad peritoneal era equivalente en ratones *gp130Δhepa* y control. Las cavidades peritoneales se lavaron 18 h después de CLP, y se contaron las células infiltrantes y se analizaron por citometría de flujo. CD11b⁺Ly6G⁺; neutrófilos, CD11b⁺F4/80⁺; monocitos y macrófagos (n = 5 por grupo, 1 de 3 experimentos independientes mostrado). (C) Supervivencia disminuida de ratones *gp130Δhepa* durante el choque endotóxico. Los ratones se trataron con LPS 20 mg/kg y se determinó la supervivencia (n = 10 por grupo, datos reunidos de 3 experimentos independientes). (D) Los niveles de citoquinas en suero en ratones *gp130ff* y *gp130Δhepa* después del tratamiento con LPS se midieron por ELISA (8 por grupo, datos reunidos de 3 experimentos independientes). (E) Daño hepático aumentado en ratones *gp130Δhepa* después de CLP. Niveles en suero de AST (izquierda) y ALT (derecha), (n = 5 por grupo, 1 de 3 experimentos independientes mostrado). (J) Tinción de H&E representativa de secciones histológicas de tejido hepático. (*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001, los datos se presentan como media ± EEM)

Figura 2. La movilización y acumulación esplénica de MDSC CD11b+Gr1+ está alterada en ratones gp130Δhepa

(A) Análisis de citometría de flujo representativo y (B) análisis gráfico de frecuencias de células CD11b⁺Gr1⁺ en médula ósea, sangre periférica y bazo en ratones *gp130ff* y *gp130Δhepa* en los puntos de tiempo indicados después de CLP (n = 5-12 por tiempo por grupo, datos reunidos de 12 experimentos independientes. #: *gp130ff* no sobrevivió a 7 y 10 d en números suficientes y por tanto no se pudo incluir en el análisis). (+; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001).

Figura 3. Las MDSC regulan las respuestas inflamatorias y confieren protección durante la septicemia

(A,B) La eliminación de células que expresan Gr1 disminuyó la supervivencia después de CLP. Los ratones *gp130ff* fueron inyectados con anticuerpos monoclonales contra Gr1 (RB6-8C5) 24 h antes y después de CLP. Se determinó la eliminación eficaz de MDSC por citometría de flujo de esplenocitos (A). Se siguió la supervivencia (B, n = 9 por grupo, datos reunidos de 3 experimentos independientes). (C) Los ratones *gp130Δhepa* recibieron o bien 5x10⁶ MDSC o solución salina 1 h y 24 h después de CLP y se determinó la supervivencia (n = 12 por grupo, datos reunidos de 3 experimentos independientes). (D) Las MDSC distorsionan la producción de citoquinas inducida por LPS de macrófagos peritoneales (MΦ). Los macrófagos se aislaron de ratones *gp130ff* sin tratar y se cocultivaron con MDSC a una proporción de 1:3 y se estimularon con LPS a las concentraciones indicadas. La liberación de citoquinas se determinó por ELISA (1 de 5 experimentos independientes mostrado). (E) Se aislaron Gr1⁺CD11b⁺ de bazos de ratones sépticos (MDSC) o ratones sin tratar previamente (MDSC(-)) y se cocultivaron con macrófagos. Algunas células de los ratones no tratados previamente se pretrataron con LPS 100 ng/ml in vitro antes del cocultivo con los macrófagos (MDSC(-)/LPS)). (E: 1 de 3 experimentos independientes mostrados). (*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001, los datos se presentan como media ± EEM).

Figura 4. Los hepatocitos lanzan un programa transcripcional dependiente de gp130 específico en respuesta a la infección

(A) PCR en tiempo real cuantitativa de muestras de hígado tomadas de ratones *gp130ff* y *gp130Δhepa* sin tratar y 12 h después de la inducción de septicemia (n = 8 por grupo, datos reunidos de 3 experimentos independientes). Se analizaron proteínas de fase aguda (alfa-2-macroglobulina, SAA), quimioquinas (KC, CxCl-2) y citoquinas

antinflamatorias (IL-1Ra). (B) se analizaron los niveles de proteínas en suero de SAA (gráfico superior) y KC (gráfico inferior) por ELISA en ratones *gp130^{ff}* y *gp130 Δ hepa* 24 h después de CLP (n = 7 por grupo, 3 experimentos independientes). (*; p<0,05, **; p<0,01, ***; p<0,001, los datos se presentan como media \pm EEM).

5 *Figura 5. SAA y KC recombinantes son protectoras durante la septicemia*

Supervivencia de ratones *gp130^{ff}* comparados con ratones *gp130 Δ hepa* tratados con (A) SAA, (B) KC, (C) IL-1Ra (Anakinra) o (D) SAA y KC en combinación o volúmenes iguales de NaCl 1 h y 24 h después de CLP (n = 9 por grupo, datos reunidos de 3 experimentos independientes). (E) Supervivencia de ratones *gp130^{ff}* tratados con anticuerpos neutralizantes anti-SAA o IgG isotipo control inactivo. (F) Niveles en suero de IFN- γ en los puntos de tiempo indicados después de CLP en ratones *gp130^{ff}* tratados con anticuerpos anti-SAA o control (n = 6 por grupo, datos reunidos de 2 experimentos independientes). (*; p<0,05, los datos se presentan como media \pm EEM).

15 *Figura 6. SAA derivada de hepatocitos reconstituye MDSC esplénicos y los protege de apoptosis*

(A) La apoptosis in vitro de MDSC inducida por TNF puede ser inhibida por SAA o sobrenadantes de hepatocitos primarios aislados de ratones *gp130^{ff}* (*gp130^{ff}* HSN) pero no de *gp130 Δ hepa* (*gp130 Δ hepa* HSN). Los hepatocitos se estimularon en el potente inductor de PFA y ligando de gp130 factor inhibidor de leucemia durante 6 h. La apoptosis de MDSC se determinó midiendo la actividad caspasa-3 (1 de 3 experimentos independientes mostrados. Los datos se presentan como media \pm EEM).

20 **Descripción detallada de la presente invención**

Los presentes inventores encontraron que las PFA hepáticas, como SAA, CRP y CXCL1, son críticas para controlar las respuestas inflamatorias durante las enfermedades inflamatorias desreguladas, septicemia, y la administración de PFA recombinantes representa un tratamiento eficaz de enfermedades inflamatorias desreguladas. Encontraron que estos efectos protectores están mediados al menos en parte fomentando la actividad de MDSC. Los presentes inventores descubrieron un papel hasta ahora no reconocido para MDSC en proteger al huésped contra la inflamación excesiva, por ejemplo, durante septicemia, sin afectar la defensa antimicrobiana y la depuración bacteriana. Por tanto, SAA es útil para el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas. SAA fomenta la movilización, acumulación y supervivencia de MDSC. La acumulación periférica de MDSC inhibe las respuestas inflamatorias excesivas. Por tanto, dirigirse a MDSC durante la septicemia mediante la administración de SAA representa una novedosa opción terapéutica prometedora.

35 Además, regular la actividad de MDSC, en particular la movilización, acumulación y supervivencia de MDSC, permite tratar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, septicemia grave, choque séptico y SDMO. Los presentes inventores descubrieron que la comunicación dependiente de gp130 entre el hígado y MDSC a través de proteínas de fase aguda SAA, CRP y CXCL1 críticamente controla las respuestas o afecciones inflamatorias, por ejemplo, durante la infección.

40 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un principio activo, en donde el principio activo es una cantidad eficaz de SAA sola o fragmento activo de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas influyendo la actividad de células supresoras de origen mieloide (MDSC), en donde las enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas son enfermedades autoinflamatorias o enfermedades autoinmunitarias con componentes autoinmunitarios o enfermedades autoinmunitarias incluyendo EII, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, rechazo a trasplante, enfermedad del injerto contra el huésped y del huésped contra el injerto, enfermedades inflamatorias locales y sistémicas, un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, septicemia grave, choque séptico, síndrome de disfunción multiorgánica, síndrome de insuficiencia de múltiples órganos y rechazo a trasplante agudo.

50 En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica contiene como principio activo una cantidad eficaz de SAA sola o fragmentos de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en la reducción, mejora o terminación de respuestas inflamatorias o ralentización de la propagación o intensificación adicional de inflamación o una enfermedad asociada con enfermedades o afecciones inflamaciones desreguladas aumentando la actividad de MDSC.

60 Además, según otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de enfermedades autoinflamatorias o enfermedades autoinflamatorias con componentes autoinmunitarios o enfermedades autoinmunitarias incluyendo EII, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, rechazo a trasplante, enfermedad del injerto contra el huésped y del huésped contra el injerto, enfermedades inflamatorias locales y sistémicas.

65 En una forma de realización preferida, el principio activo es una cantidad eficaz de SAA sola o un fragmento activo de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para uso en la reducción, mejora o terminación de respuestas inflamatorias o ralentización de la propagación o intensificación adicional de inflamación o una

enfermedad asociada con enfermedades o afecciones inflamaciones desreguladas aumentando la actividad de MDSC.

Se prefiere además que el principio activo sea un péptido invariable en la posición 33-43 de SAA.

5 En otra forma de realización preferida de la invención, la composición farmacéutica comprende además aditivos o sustancias auxiliares farmacéuticas y, preferiblemente, un soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una cantidad de SAA sola o fragmentos activos de la misma o sales farmacéuticamente aceptables de la misma para uso en el tratamiento de septicemia.

15 Según la presente invención, el término "amiloide A de suero" (SAA) se refiere a las moléculas de SAA de longitud completa conocidas como SAA1, SAA2, etc. El término también contempla análogos o fragmentos funcionales de SAA, en particular de SAA humana de No. De acceso a Gene Bank NM_000331 (Seq. ID. No. 5), y NM_030754 (Seq. ID. No. 7), P02735.

20 Como se usa en el presente documento, el término "proteína reactiva C" (CRP) se refiere a la proteína de longitud completa, por ejemplo la proteína humana NM_000567 (Seq. ID. No. 9), P02741. La presente invención contempla análogos así como fragmentos funcionales de proteína reactiva C.

25 El término "CXCL1" como se usa en el presente documento se refiere a la quimioquina CXCL1 también conocida como KC o GR01 que tiene el número de acceso de Gene Bank J03561 y NM 001511 (forma humana), Seq. ID. No. 3, P09341. La presente invención contempla análogos así como fragmentos funcionales de CXCL1.

30 Como se usa en el presente documento, el término "un fragmento funcional de la misma" se refiere a un fragmento de la respectiva proteína, por ejemplo, un péptido que muestra la misma actividad. En el presente documento, el término "SAA", "CRP" y "CXCL1" incluye fragmentos respectivos de las mismas a menos que se indique de otra manera. Además a menos que se indique explícitamente, dichos términos incluyen sales o solvatos de los compuestos.

35 El término "análogo" como se usa en el presente documento se refiere a moléculas que tienen la misma actividad que SAA, CRP y CXCL1, respectivamente. En particular, un análogo tiene la misma actividad que las respectivas proteínas de longitud completa en activar y movilizar MDSC. El término "SAA", "CRP" y "CXCL1" incluye análogos respectivos que pueden estar presentes en forma de sal o solvato a menos que se indique de otra manera.

En una forma de realización preferida, las moléculas de SAA, CRP y CXCL1 son proteínas de SEQ ID NO. 4, 6, 8, 10, respectivamente.

40 Los principios activos descritos en el presente documento pueden estar en forma de sales farmacéuticamente aceptables no tóxicas de los mismos u otras preparaciones galénicas. Las sales incluyen sales de adición ácida, tales como sales con ácidos inorgánicos o con ácidos orgánicos y también sales formadas con iones catiónicos, como iones metálicos, en particular metal alcalino o alcalinotérreo o NH4+. Además, los principios activos pueden estar presentes en forma de solvatos de los mismos (por ejemplo, hidratos).

45 Además, la composición farmacéutica que comprende como principio activo SAA sola es útil en la terapia de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, septicemia grave, choque séptico, síndrome de disfunción multiorgánica o síndrome de trasplante agudo.

50 Además, se prefiere que la composición farmacéutica comprenda como principio activo una cantidad eficaz de SAA sola o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En formas de realización preferidas, la composición farmacéutica comprende además aditivos o sustancias auxiliares farmacéuticas, preferiblemente, un soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

55 El término "composición farmacéutica" significa una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto o individuo, incluyendo un animal o ser humano. Una composición farmacéutica generalmente comprende una cantidad eficaz de un agente o principio activo y un soporte, incluyendo, por ejemplo, un soporte farmacéuticamente aceptable.

60 Un "tratamiento terapéutico" es un tratamiento administrado a un sujeto o un individuo que muestra síntomas o signos de patología, enfermedad o trastorno tratamiento que se administra al sujeto con el fin de disminuir o eliminar esos signos o síntomas de patología, enfermedad o trastorno.

65 Como se usa en el presente documento, el término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo.

La composición que comprende los compuestos según la presente invención se puede formular, dosificar, y administrar de una manera consistente con buena práctica médica. Los factores para considerar en este contexto incluyen la fase de la enfermedad o trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, el estado clínico del sujeto individual, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, y otros factores que conocen los médicos. La cantidad eficaz del agente que se va a administrar estará regida por tales consideraciones. El factor clave en seleccionar una dosis y programa apropiados es el resultado obtenido, como se indica anteriormente. Los compuestos según la presente invención se administran por cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, tópica, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, intranasal y/o intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. También se contempla la administración intratecal.

“Cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz” como se aplica a las composiciones de la presente invención se refiere a la cantidad de composición suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser la mejora de los signos y marcadores, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. En la presente invención, el resultado típicamente influirá la respuesta inflamatoria, incluyendo niveles de mediadores inflamatorios citoquinas así como frecuencia y actividad de MDSC activando o movilizandolas células o suprimiendo su actividad incluyendo inducción de apoptosis.

Se pueden emplear opcionalmente ensayos in vitro así como modelos animales para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimos. La dosis precisa que se va a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y se debe decidir según el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de curvas de dosis y respuesta derivadas de sistema de prueba in vitro o modelos animales. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra directamente o en combinación con un adyuvante.

El término “administrado” significa administración de una dosis terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica anteriormente mencionada que comprende el principio activo según la presente invención en forma de sales y solvatos del mismo a un individuo.

La composición farmacéutica según la presente invención comprende el principio activo como se describe en el presente documento y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del principio activo como se define en el presente documento y, opcionalmente, un soporte farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede administrar con un soporte fisiológicamente aceptable a un paciente, como se describe en el presente documento. Aceptable significa que el soporte sea aceptable en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y que no sea perjudicial al receptor de la misma. En una forma de realización específica, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora u otra farmacopea en general reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “soporte” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales soportes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo esos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de vaselina, aceite de sésamo y similares. El agua es un soporte preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como soportes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, caliza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, aerosoles y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y soportes tradicionales tal como triglicéridos. La formulación oral puede incluir soportes estándar tal como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, magnesio, carbonato, etc. Se describen ejemplos de soportes farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin (18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos, sales o solvatos de los mismos anteriormente mencionados, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de soporte de modo que se suministre la forma para la administración apropiada al paciente. La formulación debe ajustarse al modo de administración.

Típicamente, el soporte farmacéutica o terapéuticamente aceptable es un medio soporte que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que no es tóxico para el huésped o paciente.

En otra forma de realización preferida, la composición se formula según procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína

para aliviar el dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes se suministran bien por separado o mezclados en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad del agente activo. Donde la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Donde la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua para inyección o solución salina estéril de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La composición farmacéutica para uso según la invención se puede formular como formas neutras o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Estas y otras formas de realización se divulgan y están abarcadas por la descripción y los ejemplos de la presente invención. Se puede recuperar bibliografía adicional respecto a cualquiera de los métodos, usos y compuestos que se van a emplear según la presente invención de bibliotecas públicas, usando, por ejemplo, dispositivos electrónicos.

En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere al uso de una cantidad eficaz de SAA sola o sales farmacéuticamente aceptables de la misma para la activación y movilización así como para la supervivencia de MDSC, por ejemplo, para tratar enfermedades inflamatorias desreguladas excesivas.

Es decir, cuando se producen enfermedades inflamatorias desreguladas excesivas, como es el caso en septicemia, en un individuo, se administran los compuestos según la presente invención a dicho individuo afectado con una enfermedad inflamatoria desregulada excesiva para aliviar para ralentizar dicha inflamación, o para reducir la intensificación de la inflamación o para terminar las respuestas inflamatorias.

Además, se puede usar una cantidad eficaz de SAA sola o sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma para suprimir la inflamación en individuos afectados con enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas.

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la invención adicionalmente.

Ejemplos

Materiales y métodos

Ratones. Se han usado ratones macho *gp130^{ff}*, *gp130 Δ hepa*, *gp130Stat Δ hepa* y *gp130Ras Δ hepa* a la edad de 8-12 semanas, como se ha descrito previamente (Klein et al., 2005). Todos los experimentos fueron aprobados por El Comité de Cuidado y Uso de Animales institucional. Todos los experimentos se llevaron a cabo según la 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' (publicación del NIH 86-23, revisada en 1985).

Ligadura y punción cecal (CLP). Se indujo septicemia polimicrobiana por CLP. Brevemente, se anestesiaron los ratones; el ciego se ligó y punzó dos veces con una aguja de 20G. Los ratones se controlaron cada 6 h durante 24 h y después cada 12 h hasta el final del experimento (entre 5 y 10 días).

Choque endotóxico inducido por LPS. Los ratones recibieron LPS 20 mg/kg por vía intraperitoneal y se controlaron cada 6 horas durante y después cada 12 h hasta el final del experimento (entre 3 y 5 días).

Aislamiento y cultivo de células. Se aislaron MDSC de bazo de ratones *gp130^{ff}* 5 días después de CLP. Después del sacrificio, los bazo se explantaron y se aislaron esplenocitos por digestión con colagenasa. Se lisaron glóbulos rojos usando tampón de lisis Pharmlyse (BD Biosciences). Se purificaron MDSC de suspensión celular por separación celular magnética (MACS, Miltenyi Biotec) usando bolas magnéticas conjugadas a anti-CD11b (Miltenyi Biotec). Se determinó la pureza por citometría de flujo. Solo se usaron preparaciones celulares con una pureza de >90% para experimentos adicionales. Alternativamente, los ratones se inyectaron con LPS 5 mg/kg i.p. y 5 días después se purificaron esplenocitos CD11b⁺Gr1⁺ por separación de FACS (separador celular Influx, BD Biosciences). Para experimentos de cultivo durante la noche, las células se mantuvieron en RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con suero fetal de ternera inactivado por calor al 10% (Sigma). Se cultivaron MDSC con las siguientes sustancias como se indica, TNF alfa murino (Peprotech), LPS (Sigma), SAA (Peprotech).

Para la generación de macrófagos intraperitoneales, los ratones se inyectaron con 1 ml de tioglicolato (BD Biosciences) por vía intraperitoneal. Se recogieron las células totales después de 72 h y se sembraron a 1×10^6 /ml en RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (Sigma) y penicilina/estreptomicina al 1% (Invitrogen). Después de cultivar durante la noche las células no adherentes se eliminaron y la pureza de los macrófagos se confirmó por tinción de F4/80 y citometría de flujo.

Se aislaron hepatocitos primarios de ratones *gp130^{ff}* y *gp130 Δ hepa* por perfusión con colagenasa como se ha descrito previamente (Klein et al., 2005), se cultivaron 1×10^6 células en placas de cultivo de 6 cm con DMEM (Invitrogen) que contenía glucosa 4,5 g/l, SFT al 10%, y penicilina/estreptomicina durante la noche. Las células se estimularon con factor inhibidor de leucemia LIF 50 ng/ml (PeproTech) durante 6 h, y los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a -80°C .

Cultivo in vitro de MDSC. Las condiciones de cultivo se han usado previamente (Delano et al., 2007). Después de la purificación por MACS de MDSC esplénicas de ratones *gp130^{ff}* control cinco días después de CLP. Las células se sembraron a 10^6 células/ml en RPMI 1640 suplementado con suero fetal de ternera al 10%, l-glutamina 2 mM, penicilina 200 U/ml, y estreptomicina 50 $\mu\text{g/ml}$, y se cultivaron durante la noche con los compuestos indicados. Para los ensayos de suspensión in vitro, se cocultivaron MDSC purificadas con macrófagos peritoneales o derivados de médula ósea, se estimularon con LPS (Sigma) y la posterior liberación de citoquinas se midió por ELISA. En algunos casos las MDSC se separaron de los macrófagos en placas transwell (tamaño de poro 0,4 μm , Corning Inc). Para los estudios de migración in vitro, se sembraron células $\text{CD11b}^+\text{Gr1}^+$ esplénicas o derivadas de médula ósea en placas transwell (tamaño de poro 3 μm , Corning Inc.) y se añadieron cantidades crecientes de KC recombinante (PeproTech) al pocillo inferior. Después de 3 h se contaron las células migradas en un hemocitómetro y se calculó el índice de migración de células migradas/no migradas.

Transferencia de MDSC adoptivas. Se aislaron MDSC como se ha descrito anteriormente, los ratones *gp130 Δ hepa* recibieron 5×10^6 MDSC por vía intravenosa 1 h y 24 h después de CLP. Se trataron ratones control con volúmenes iguales de NaCl.

Eliminación de células Gr1^+ . Se han usado anticuerpos monoclonales contra Gr1 de células de hibridoma RB6-8C5 (Tepper, R.I., et al, 1992, Science 257, 548-551) y ratones *gp130^{ff}* recibieron 10 mg/kg de anticuerpos 24 h antes y 24 h después de CLP. La eficacia de la eliminación se siguió por FACS. Los ratones control recibieron anticuerpos IgG de isotipo no específicos.

Tratamiento de animales con SAA, KC e IL1Ra recombinantes. Los ratones recibieron 0,8 mg/kg de SAA recombinante (PeproTech) o 40 $\mu\text{g/kg}$ de KC (PeproTech) o una combinación de ambas por vía intravenosa 1 h y 24 h después de CLP. Los ratones control recibieron el mismo volumen de solución salina. Se inyectó IL-1Ra (Anakinra) (Kineret, Amgen) por vía subcutánea cada 4 h durante un periodo de 24 h.

Neutralización sistémica de SAA. Los ratones recibieron 50 mg/kg de una combinación de anticuerpos monoclonales anti-SAA (mc29 y mc4, 1:1) dirigidos contra la región muy conservada (invariable) de SAA (véase anteriormente) i.p. 12 h antes de 33 mg/kg 12 h después de CLP. Los ratones control recibieron cantidades equivalentes de anticuerpos control inactivos (mc1). Los tres anticuerpos se describen en Linke et al., J. Histochem, Cytochem. 32. 322328 (1984).

Medidas de citoquinas. Se recogieron muestras de suero por sangrado a los tiempos indicados. Se midieron IL-6, TNF, IFN- γ y KC por ELISA (R&D Systems). SAA se midió por ELISA (Biosource). Se midieron IL-6, TNF, IL-12 e IL-10 de sobrenadantes de cultivo celular por ELISA (R&D systems).

Citometría de flujo. Se incubaron suspensiones celulares con los anticuerpos conjugados a fluorocromos enumerados a continuación y se analizaron con un BD FACS Canto II (BD Biosystems). CD45, Gr1 (ambos BD Biosciences), CD11b (eBioscience).

Análisis por micromatrices génicas y PCR en tiempo real. Se sacrificaron ratones *gp130^{ff}* y *gp130 Δ hepa* sin tratamiento previo o 12 h después de CLP. Se explantaron los hígados y muestras de tejido se congelaron inmediatamente. Se usaron muestras de ARN de hígado de 3 ratones por grupo experimental para análisis por micromatrices. Las muestras de ARN se prepararon e hibridaron en matrices Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0. Los niveles de expresión génica se calcularon aplicando el algoritmo medio multichip robusto corregido por contenido en GC (GCRMA) y un fichero Gene Chip Description File (CDF) remodelado. Se identificaron genes diferencialmente expresados usando estadística Limma. Los genes con un valor de p corregido similar o por debajo de 0,05 y/o cambio en veces por encima de 1,5 o por debajo de -1,5 se consideraron significativamente regulados. Las descripciones detalladas de los métodos aplicados están disponibles a petición. Se usaron Ingenuity Pathway Analysis (v5.5, Ingenuity Systems) y ErmineJ Gene Score Resampling para identificar las rutas de señalización canónicas más significativamente cambiadas o procesos biológicos Gene Ontology (GO) en ratones *gp130^{ff}* y *gp130 Δ hepa* 12 h después del inicio de la septicemia, usando un valor de p similar a o por debajo de 0,05 como criterio de entrada. Los cambios en veces de genes seleccionados se visualizaron en un diagrama de mapa de calor.

Se realizó análisis de PCR en tiempo real para confirmar los datos de la matriz génica. Se aisló ARN usando columnas RNeasy (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La síntesis de la primera hebra se realizó con cebadores de oligo dT y la transcripción inversa con transcriptasa inversa de M-MLV (Invitrogen). La PCR en tiempo real cuantitativa se realizó usando SYBR Green Reagent (Invitrogen Corp.) en un sistema de PCR en tiempo real ABI-Prism 7300 (Applied Bioscience). Las reacciones se realizaron en duplicado y se usaron valores de GAPDH para normalizar la expresión génica.

Determinación de la carga bacteriana. Los ratones se sacrificaron 24 h después de CLP. La cavidad peritoneal se lavó y el líquido de lavado se sembró en placas de sangre-agar y placas de agar McKonkey en diluciones en serie. Los bazoos se retiraron, homogenizaron y sembraron en diluciones en serie en placas de agar. Se contaron unidades formadoras de colonias después de incubación durante la noche.

Determinación de apoptosis por actividad caspasa-3 quinasa. Se cultivaron MDSC purificadas durante la noche con los compuestos indicados. A continuación las células se lavaron y lisaron a 4°C en Tris/HCl 5 mmol/l, pH 8,0, ácido etilendiaminotetraacético 20 µmol, Triton X-100 al 0,5%. Los lisados se clarificaron por centrifugación a 13.000 g durante 10 min. La mezcla de reacción contenía 30 µg de lisados celulares, 1000 µl de tampón de ensayo (HEPES 20 mmol/l, pH 7,5, glicerol al 10%, ditiotreitil 2 mM), y sustrato de caspasa-3 20 mM (Ac-DEVD-AMC) (BD Pharmingen). Después de 2 h de incubación en la oscuridad, la actividad enzimática se midió en espectrofotómetro de luminiscencia (LS-50; Perkin-Elmer).

Determinación de apoptosis por tinción de anexina-V. Las células se tiñeron para CD45, Gr1 y CD11b seguido por incubación con anexina-V-FITC (BD Biosciences) y se analizaron por citometría de flujo.

Análisis estadístico. Se determinó la significación estadística por la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes implementada en Excel (versión 11.0, Microsoft).

En el presente documento se muestra que la deficiencia en gp130 hepática disminuye gravemente la supervivencia de ratones *gp130Δhepa* durante la septicemia polimicrobiana comparados a hermanos de camada controles (Fig. 1A). Los ratones control tenían sitios loxP flanqueando el exón 16 del gen de gp130, pero no expresaban la recombinasa Cre (*gp130^{ff}*). Los efectos protectores de la señalización de gp130 hepática requería la activación de Stat3, demostrado por una supervivencia marcadamente disminuida de *gp130StatΔhepa* comparado con animales *gp130^{ff}* y *gp130RasΔhepa*. Las citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF e interferón gamma (IFN-γ) están muy implicadas en la patogénesis de choque séptico y posterior insuficiencia orgánica. En modelo de ratón descrito en el presente documento, los niveles de estas citoquinas alcanzan un pico a las 6 h en todos los animales. En contraste, mientras que los niveles de citoquinas sistémicas se normalizaron rápidamente en ratones *gp130^{ff}* controles y *gp130RasΔhepa*, se mantuvieron persistentemente elevados después de 24 y 48 h en animales *gp130Δhepa* y *gp130StatΔhepa*.

A continuación, se exploró la posibilidad de que la depuración bacteriana deficiente en ratones que carecen de señalización gp130/Stat3 hepática produjera niveles de citoquinas elevados. Sin embargo, cuando se examinan los recuentos bacterianos de la cavidad peritoneal y el bazo, sembrando diluciones en serie del líquido de lavado peritoneal u homogenizados de bazo 12 h después de CPL, no se han encontrado diferencias entre los grupos y casi todos los animales habían depurado las bacterias de los bazoos después de 36 h. Además, el reclutamiento de leucocitos a la cavidad peritoneal era igual en todos los grupos (Fig. 1B) lo que indica que la respuesta inmunitaria innata estaba intacta. Esto sugería que la contrarregulación alterada de la respuesta inflamatoria inicial más que la defensa antibacteriana deficiente era responsable para la inflamación exacerbada y mortalidad aumentada de ratones *gp130Δhepa*. Para probar adicionalmente esta hipótesis se indujo choque endotóxico estéril por inyección de lipopolisacárido (LPS). Similar al modelo de infección, la deficiencia de gp130 hepática aumentó fuertemente la mortalidad (Fig. 1C) y causó inflamación prolongada (Fig. 1D). Se han estudiado efectos intrínsecos de hígado adicionales durante la septicemia y se ha encontrado que los ratones *gp130Δhepa* mostraron niveles en suero de enzimas hepáticas marcadamente elevados (Fig. 1E) y necrosis de hepatocitos pronunciada comparados con ratones *gp130^{ff}* después de CLP. La lesión hepática aumentada no solo reflejaba la gravedad de la inflamación sistémica sino que también confirmaba la función autoprotectora de la señalización IL-6/gp130 en hepatocitos. Colectivamente, estos experimentos sugerían que factores derivados del hígado eran esenciales para controlar la respuesta inflamatoria a la infección.

A continuación se investigó si la inflamación desregulada en ratones *gp130Δhepa* estaba asociada con cambios en la composición de células inmunitarias en la sangre periférica, órganos linfoides y el hígado. Especialmente se enfocó en las MDSC, una población inmadura de células (precursoras) mieloides caracterizada por expresión de superficie de CD11b y Gr1 en ratones. Las MDSC han ganado recientemente atención significativa por su papel en neoplasias malignas. De forma interesante, un estudio previo describió la expansión de MDSC en la médula ósea y acumulación en el bazo de ratones sépticos (Delano et al., 2007). Por tanto, se ha seguido la expansión de células CD11b⁺Gr1⁺ en la médula ósea, así como su movilización a la sangre periférica y la acumulación en el bazo, ganglios linfáticos y el hígado de ratones a varios tiempos después de la inducción de septicemia polimicrobiana. Como se muestra en el presente documento aunque las células CD11b⁺Gr1⁺ se expandieron de forma similar en la médula ósea de todos los ratones, la población de células CD11b⁺Gr1⁺ circulantes en la sangre estaba significativamente reducida en ratones *gp130Δhepa* (Fig. 2A, B). Se ha observado la acumulación adicional de MDSC en los bazoos de ratones control *gp130^{ff}* sépticos como se ha descrito previamente (Delano et al., 2007) (Fig. 2A, B). Sin embargo, el enriquecimiento esplénico de MDSC después de CLP estaba completamente bloqueado en animales *gp130Δhepa*, como se demuestra por citometría de flujo y microscopía de inmunofluorescencia (Fig. 2A, B). La acumulación hepática de células CD11b⁺Gr1⁺ también estaba significativamente disminuida en ratones *gp130Δhepa*. No se observó aumento de MDSC en ganglios linfáticos mesentéricos en ninguno de los animales.

Estos datos sugieren fuertemente que las señales dependientes de gp130 en el hígado facilitaban la movilización y acumulación periférica de MDSC durante la septicemia polimicrobiana.

La tinción CD11b/Gr1 positiva no es única para MDSC especialmente en compartimentos con números relativamente altos de células mieloides como la médula ósea y la sangre periférica. La población de células CD11b⁺Gr1⁺ por tanto no es necesariamente equivalente a MDSC. En ausencia de marcadores de superficie exclusivos las MDSC se definen mejor funcionalmente, a través de su capacidad de suprimir respuestas inmunitarias. Por tanto, se analizaron sus funciones durante la septicemia. Se han reconocido células mieloides con funciones antiinflamatorias en ratones con tumores durante mucho tiempo (Young et al., 1987), pero su significación funcional para la evasión inmunitaria tumoral, angiogénesis y metástasis solo se ha apreciado más ampliamente recientemente (Nagaraj et al., 2007; Yang et al., 2008). Las MDSC también se han implicado en otros estados patológicos como autoinmunidad (Haile et al., 2008; Zhu et al., 2007). Sin embargo, a pesar de avances significativos en cáncer, solo hay datos limitados sobre las funciones de MDSC en infecciones y septicemia. Se ha descrito expansión de MDSC con propiedades supresoras de células T durante la septicemia en ratones (Delano et al., 2007). A diferencia de muchos cánceres, su contribución a la progresión de la enfermedad y supervivencia del huésped durante infecciones todavía está sin definir. Por tanto, un fin de la presente invención es establecer un enlace entre deficiencia de gp130 hepática, posterior alteración de la acumulación de MDSC y supervivencia reducida. Se han elegido dos enfoques independientes para probar la relevancia de MDSC para la supervivencia del huésped. Primero se eliminaron MDSC Gr1⁺ en ratones control usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra Gr1. La eliminación de MDSC aumentó significativamente la mortalidad comparada con ratones tratados con anticuerpo de isotipo control (Fig. 3A, B). Puesto que el tratamiento anti-Gr1 no es específico para MDSC y también se dirigiría a otras células Gr1⁺ como neutrófilos, se decidió transferir adoptivamente MDSC, aisladas de hígados de donantes *gp130^{ff}* 5 días después de CLP, en animales *gp130 Δ hepa*. MDSC purificadas de bazo de ratones *gp130^{ff}* mostraron una heterogeneidad morfológica y fenotipo inmaduro característicos. Aproximadamente el 50% de las células CD11b⁺Gr1⁺ expresaban Ly6G, un marcador asociado con el subconjunto PMN de MDSC. De forma importante, las MDSC invirtieron eficazmente los efectos perjudiciales de la deficiencia de gp130 hepática durante la infección (Fig. 3C). La transferencia de MDSC aumentó la supervivencia de ratones *gp130 Δ hepa* a niveles de tipo salvaje (Fig. 3C), lo que demuestra un papel clave de las MDSC en regular las respuestas inflamatorias a la infección. Estudios previos han mostrado funciones supresoras de MDSC en células T (Delano et al., 2007). En el presente documento se muestra que MDSC esplénicas inducidas por septicemia purificadas inhibían la liberación de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS al tiempo que inducían fuertemente la producción de IL-10 en macrófagos primarios (Fig. 3D, E). Este efecto distorsionador dependía de la activación de MDSC *in vivo*. Las células CD11b⁺Gr1⁺ que se separaron de los bazo de ratones sin tratar tenían fuertemente alterada su capacidad de inhibir la liberación de IL-12 e inducir la producción de IL-10 en macrófagos tratados con LPS (Fig. 3E). La preactivación de células CD11b⁺Gr1⁺ de ratones no tratados previamente con LPS *in vitro* antes del cocultivo con macrófagos, parcialmente restableció la inducción de IL-10 pero fracasó para recuperar la inhibición de la producción de IL-12 (Fig. 3E). Por tanto, las MDSC generadas durante la infección muestran un fenotipo antiinflamatorio fuerte, en contraste a las células CD11b⁺Gr1⁺ esplénicas en condiciones de estado estacionario. Las funciones antiinflamatorias de MDSC eran en gran parte dependiente de contacto directo célula-célula. La separación de MDSC y macrófagos en un sistema Transwell redujo fuertemente la inducción de IL-10, sin embargo, solo bloqueó parcialmente la supresión de IL-12, lo que indica que factores solubles adicionales como TGF- β también pueden desempeñar un papel. Los resultados mostrados en el presente documento sugieren que la interacción directa de MDSC con células efectoras innatas puede constituir un mecanismo autorregulador novedoso de respuestas inmunitarias innatas a la infección.

Hasta ahora, el conocimiento sobre factores y condiciones que inducen la producción y función de MDSC así como su migración a tejidos periféricos u órganos linfoides es incompleto. Observaciones hechas en modelos de cáncer murinos han sugerido que factores derivados de tumores inducen la expansión de MDSC e inhiben su diferenciación a CD por activación de rutas de la quinasa Janus (JAK)2/Stat3 en MDSC (Nefedova et al., 2004). En el presente modelo, la señalización por JAK2/Stat3 en células hematopoyéticas estaba intacta y no se han observado diferencias en la expansión de células CD11b⁺Gr1⁺ en la médula ósea (Fig. 2A, B). En su lugar, la delección específica de hepatocitos de la señalización gp130/Stat3 anuló la acumulación periférica de MDSC. Por tanto, el fin era identificar factores dependientes de gp130 derivados de hígado que estuvieran implicados en la movilización y acumulación periférica de MDSC, controlando de esta manera la inflamación. El análisis transcripcional de 16.475 genes por micromatriz génica en muestras de tejido hepático tomadas de ratones *gp130^{ff}* y *gp130 Δ hepa* sin tratar y sépticos reveló un total de 3.936 genes que estaban regulados más de 1,5 veces 12 h después de CLP, 2.266 de los cuales estaban diferencialmente regulados por gp130. Enfocándose en proteínas secretadas, se advirtieron tres grupos de genes con una inducción dependiente de gp130 particularmente fuerte: 1. PFA clásicas como alfa-2-macroglobulina, CRP o amiloide A de suero (SAA), 2. quimioquinas con actividad quimiotáctica en células mieloides, como CXCL1 (KC), CXCL2 o Ccl3 (MIP-1 α), y 3. citoquinas antiinflamatorias como el antagonista del receptor de IL-1 (IL1Ra). Estos resultados se confirmaron adicionalmente RT PCR en tiempo real (Fig. 4A). Según esto, los niveles en suero de SAA y CXCL1 estaban fuertemente elevados en ratones *gp130^{ff}* pero no en *gp130 Δ hepa* 24 h después de CLP, lo que muestra que la señalización de gp130 hepática controla los niveles sistémicos de estas proteínas (Fig. 4B). Los niveles de transcrito de IL-6 también estaban significativamente reducidos en ratones *gp130 Δ hepa* comparados con los controles (8,3 frente a 1,9 veces de inducción, datos no mostrados), lo que es digno de notar ya que se cree ampliamente que el hígado es una fuente principal de IL-6 y TNF durante la septicemia. En contraste se

encontró que los ratones *gp130 Δ hepa* mostraron niveles en suero elevados de IL-6 después de CLP a pesar de producción hepática reducida de IL-6. No se encontró que los niveles de transcrito hepático de TNF estuvieran diferencialmente regulados por gp130. Esto sugiere una producción principalmente extrahepática durante la septicemia, por ejemplo, en macrófagos activados por productos microbianos.

Habiendo identificado genes hepáticos regulados por gp130 durante la infección polimicrobiana, el fin era determinar sus contribuciones funcionales a la regulación de la respuesta inflamatoria y acumulación de MDSC. Para este fin, ratones *gp130 Δ hepa* que fracasaron en inducir SAA, CXCL1 e IL1Ra se han tratado con las proteínas recombinantes respectivas. La administración de SAA o CXCL1 sola parcialmente restableció la supervivencia (Fig. 5A, B), mientras que la combinación de ambas proteínas completamente rescató ratones *gp130 Δ hepa* normalizando los índices de supervivencia y niveles sistémicos de citoquinas (Fig. 5A, B, D). En acusado contraste, el tratamiento con la citoquina antiinflamatoria IL1Ra (Anakinra) produjo mortalidad del 100% de los ratones *gp130 Δ hepa* después de 4 d (Fig. 5C). Los efectos perjudiciales del tratamiento con IL1Ra pueden ser debidos a depuración bacteriana alterada o reparación defectuosa de tejidos en ausencia de IL-1.

Notablemente, la administración de KC recombinante, conocida como un potente quimioatrayente para células polimorfonucleares, elevó significativamente el número de células CD11b⁺Gr1⁺ circulantes en ratones *gp130 Δ hepa* sépticos. KC recombinante también indujo quimiotaxis de MDSC purificadas in vitro. En contraste, los números de MDSC esplénicas estaban solo marginalmente elevados en animales *gp130 Δ hepa* tratados con KC. Por tanto, era concebible que KC estuviera implicada en la movilización de células mieloides desde la médula ósea, mientras que la acumulación de MDSC en el bazo requería factores adicionales. Por tanto se probó la capacidad de SAA para restablecer MDSC esplénicas. SAA se considera principalmente como una proteína proinflamatoria con propiedades activadoras en células inmunitarias maduras, y también se ha implicado en la patogénesis de inflamación crónica como aterosclerosis. El tratamiento con SAA de ratones *gp130 Δ hepa* durante la septicemia redujo eficazmente la mortalidad (Fig. 5B, D) y la inflamación, pero de forma importante, casi restableció los números de MDSC en el bazo especialmente cuando se dio en combinación con KC, lo que demuestra que SAA era suficiente para rescatar ratones *gp130 Δ hepa* durante la septicemia. Sin embargo, no estaba claro si SAA se requería en el contexto de un APR intacto. Bloquear la actividad de SAA en ratones *gp130 Δ ff* por inyección de anticuerpos neutralizantes anti-SAA aumentó fuertemente la mortalidad relacionada con septicemia y niveles sistémicos de citoquinas (Fig. 5F, G). Dadas las grandes cantidades y gran variedad de PFA producidas durante la septicemia, fue sorprendente encontrar que la inhibición de SAA sola tenía tales efectos drásticos e indica un papel central para esta PFA en la regulación de la respuesta inflamatoria a la infección. Por tanto, las PFA hepáticas fomentan la acumulación de MDSC y regulan la inflamación durante la septicemia. Sin embargo, cómo las MDSC emigran al bazo y no a otros órganos linfoides como el ganglio linfático mesentérico no está claro hasta este punto y necesita investigación adicional.

El hígado podría ser una fuente potente de proteínas que inducen MDSC no solo en septicemia sino potencialmente también en cáncer. A este respecto también es digno de mención que se ha mostrado que las MDSC se acumulan en carcinoma hepatocelular humano, un cáncer que se sabe que escapa notoriamente a respuestas inmunitarias antitumorales (Hoechst et al., 2008).

Además de JAK2/Stat3, cuyo papel para la inducción de MDSC se ha estudiado principalmente en neoplasias malignas, se mostró previamente que la expansión de MDSC durante la septicemia polimicrobiana requería señalización de MyD88 (Delano et al., 2007). Sin embargo, no está claro si la activación directa de MyD88 en MDSC, o alternativamente mecanismos indirectos como producción dependiente de MyD88 de citoquinas como IL-6 son responsables para estos efectos. La presente invención no aborda directamente este asunto, pero los resultados demuestran que citoquinas IL-6 y posterior señalización de gp130 dependiente de MyD88/NF κ B en hepatocitos es un elemento crucial para la acumulación periférica de MDSC en septicemia. Este concepto es intrigante porque implica un mecanismo de retroalimentación negativa novedoso de respuestas inflamatorias mediadas por TLR.

La contracción de células inmunitarias, particularmente linfocitos, durante infecciones graves es un fenómeno bien conocido. Aquí, se encontró un mayor porcentaje de MDSC apoptóticas anexinaV⁺ en bazos de ratones *gp130 Δ hepa* comparados con ratones *gp130 Δ ff*. De forma interesante, la fracción apoptótica estaba significativamente reducida en animales *gp130 Δ hepa* tratados con SAA. Por tanto se razonó que SAA fomenta la supervivencia de periféricos. Por tanto se probó el potencial de SAA recombinante para inhibir apoptosis de MDSC aislados de bazos de ratones sépticos. En efecto, se encontró que tanto SAA recombinante como sobrenadante de hepatocitos primarios estimulados de ratones *gp130 Δ ff* pero no de *gp130 Δ hepa* prevenían la apoptosis de MDSC inducida por TNF (Fig. 6). Los hepatocitos primarios aislados de ratones *gp130 Δ ff* y *gp130 Δ hepa* controles se estimularon con factor inhibidor de leucemia, un fuerte agonista de gp130, para inducir la producción de proteínas dependiente de gp130. La adición de SAA al sobrenadante de hepatocitos *gp130 Δ hepa* restableció completamente la capacidad antiapoptótica (Fig. 6), lo que demuestra que SAA derivada de hígado, producida en respuesta a la activación de gp130 protege a las MDSC de apoptosis. Por tanto, SAA inhibe la apoptosis de MDSC in vitro e in vivo. El mecanismo subyacente al efecto antiapoptótico de SAA no está claro actualmente. De forma interesante, SAA se identificó recientemente como un ligando endógeno de TLR2 que activa la señalización de MyD88 (Cheng et al., 2008a). Por tanto es concebible que SAA active TLR2/MyD88 en MDSC para protegerlas de apoptosis. Esto también estaría en línea con el requisito previamente descrito para MyD88 para la expansión de MDSC durante septicemia (Delano et al., 2007).

Colectivamente, estos resultados definen un papel esencial de las proteínas derivadas del hígado en regular la movilización y supervivencia de MDSC en septicemia, y la producción de estos factores requiere la señalización gp130/Stat3 en hepatocitos.

5 En resumen, la presente invención demuestra que las MDSC tienen potentes funciones antiinflamatorias protectoras del huésped durante infecciones polimicrobianas. Los animales *gp130 Δ hepa* que fracasaron en acumular MDSC en el bazo padecían inflamación desregulada y mortalidad aumentada. La transferencia adoptiva de MDSC esplénicas en ratones *gp130 Δ hepa* confirió protección. Se sabe que las células inmunitarias adaptivas se requieren para controlar las respuestas inmunitarias innatas a infecciones (Kim et al., 2007). Como se muestra aquí (Fig. 3) y
10 previamente en MDSC derivadas de cáncer (Sinha et al., 2007), las MDSC pueden interactuar directamente con macrófagos e inhibir la liberación de citoquinas proinflamatorias. Por tanto, representan un componente autorregulador del sistema inmunitario innato, que contribuye a equilibrar cuidadosamente la respuesta inflamatoria a la infección bacteriana y septicemia.

15 Los resultados como se muestran en el presente documento enlazan directamente las funciones de MDSC durante la infección a PFA hepáticas inducidas por la activación de gp130/Stat3. Nuestro estudio muestra que las PFA son reguladores cruciales de las respuestas inflamatorias a la infección y resalta la estrecha relación entre hepatocitos y células inmunitarias innatas y SAA desempeña un papel clave en este proceso regulador.

20 Formas de realización adicionales que no son parte de la invención son:

una composición farmacéutica que contiene como un principio activo una cantidad eficaz de i) SAA, CRP y/o CXCL-1 o análogos o fragmentos activos de las mismas o ii) inhibidores de la actividad de SAA, CRP y/o CXCL-1, o una sal farmacéuticamente aceptable de i) o ii) para el uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas influyendo la actividad de células supresoras de origen mieloide (MDSC);
25

la composición farmacéutica que contiene como principio activo una cantidad eficaz de SAA, CRP y/o CXCL-1 o análogos o fragmentos activos de las mismas o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas para uso en la reducción, mejora o terminación de respuestas inflamatorias o ralentización de la propagación o intensificación adicional de inflamación o una enfermedad asociada con enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas aumentando la actividad de MDSC;
30

la composición farmacéutica que se usa en el tratamiento de enfermedades autoinflamatorias o enfermedades autoinflamatorias con componentes autoinmunitarios o enfermedades autoinmunitarias incluyendo EII, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, hepatitis autoinmunitaria, rechazo a trasplante, enfermedad de injerto contra el huésped o del huésped contra el injerto, daño hepático tóxico agudo y tóxico crónico, enfermedades inflamatorias locales y sistémicas;
35

la composición farmacéutica que se usa en la terapia de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, septicemia grave, choque séptico, síndrome de disfunción multiorgánica, síndrome de insuficiencia de múltiples órganos o rechazo a trasplante agudo;
40

la composición farmacéutica que contiene como principio activo una cantidad eficaz de un inhibidor de la actividad de SAA, CRP y/o CXCL-1, en particular anticuerpos neutralizantes contra SAA, CRP y/o CXCL-1, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para uso en el tratamiento de neoplasias malignas o enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas, por lo cual la respuesta inflamatoria se suprime, mediante la inhibición de acumulación, frecuencia y/o actividad de MDSC;
45

el principio activo que es una cantidad eficaz de SAA, un análogo o fragmento activo de la misma, o un inhibidor de SAA, o una sal farmacéuticamente de la misma;
50

el principio activo que es una cantidad eficaz de SAA, un análogo o fragmento activo de la misma, en combinación con CXCL-1, un análogo o fragmento activo de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

55 la composición farmacéutica que comprende aditivos o sustancias auxiliares farmacéuticos y, preferiblemente, un soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable;

el uso de una cantidad eficaz de SAA, CRP y/o CXCL-1 o análogos o fragmentos activos de las mismas, o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas, para la activación y movilización de MDSC para tratar enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas excesivas;
60

el uso de una cantidad eficaz de inhibidores de la actividad de SAA, CRP y/o CXCL-1 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para reducir la frecuencia, acumulación y/o actividad, y/o para eliminar MDSC para tratar enfermedades o afecciones caracterizadas por respuesta inmunitaria suprimida;
65

el uso de una cantidad eficaz de SAA, CRP y/o CXCL-1 o análogos o fragmentos activos de las mismas, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para suprimir la inflamación en individuos afectados con enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas;

5 un método para el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas, en particular, septicemia, administrando una cantidad eficaz de un principio activo de SAA, CRP y/o CXCL-1 o análogos de fragmentos activos de las mismas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas a un individuo en necesidad de ello; y

10 un método para el tratamiento de neoplasias malignas en individuos administrando una cantidad eficaz de un inhibidor de SAA, CRP y/o CXCL-1 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para inactivar, eliminar o suprimir de otra manera MDSC.

Delano, M.J., et al., 2007. J Exp Med. 204:1463-74.

Haile, L.A., et al., 2008. 135:871-81, 881 e1-5.

15 Hoechst, B., et al., 2008. Gastroenterology. 135:234-43.

Kim, K.D., et al., 2007. Nat Med. 13:1248-52.

Klein, C., T. et al., 2005. J Clin Invest. 115:860-9.

Nagaraj, S., et al., 2007. Nat Med. 13:828-35.

Nefedova, et al., 2004. J Immunol. 172:464-74.

20 Rebouissou, S., et al., 2009. Nature. 457:20

Sander, L., et al., 2009. J of Hepatology. 50: página S280

Sinha, P., et al., 2007. J Immunol. 179:9

Yang, L., et al., 2008. Cancer Cell. 13:23-35.

Young, et al., 1987. Cancer Res. 47:100-5.

25 Zhu, B., et al., 2007. J Immunol. 179:5228-37.

Lista de secuencias

30 <110> RWRH Aachen

<120> Composición farmacéutica para tratamiento dirigido de fase aguda de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas agudas y crónicas.

35 <130> 4589-003

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

40 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

45 <220>

<223> péptido

<400> 1

Tyr Ile Gly Ser Asp
1 5

50 <210> 2

<211> 5

<212> PRT

55 <213> artificial

<220>

<223> péptido

60 <400> 2

Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 3

ES 2 560 538 T3

Met Ala Arg Ala Ala Leu Ser Ala Ala Pro Ser Asn Pro Arg Leu Leu
1 5 10 15
Arg Val Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Ala Gly Arg Arg Ala
20 25 30
Ala Gly Ala Ser Val Ala Thr Glu Leu Arg Cys Gln cys Leu Gln Thr
35 40 45
Leu Gln Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Val Asn Val Lys ser
50 55 60
Pro Gly Pro His Cys Ala Gln Thr Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asn
65 70 75 80
Gly Arg Lys Ala Cys Leu Asn Pro Ala Ser Pro Ile Val Lys Lys Ile
85 90 95
Ile Glu Lys Met Leu Asn Ser Asp Lys Ser Asn
100 105

- <210> 5
- 5 <211> 716
- <212> ADN
- <213> SSA1 humano

- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (224)..(592)

- <400> 5

```

aggctcagta taaatagcag ccaccgctcc ctggcaggca gggacccgca gctcagctac      60
agcacagatc aggtgaggag cacaccaagg agtgattttt aaaacttact ctgttttctc      120
tttcccaaca agattatcat ttcctttaaa aaaaatagtt atcctggggc atacagccat      180
accattctga aggtgtctta tctcctctga tctagagagc acc atg aag ctt ctc      235
                                     Met Lys Leu Leu
                                     1

acg ggc ctg gtt ttc tgc tcc ttg gtc ctg ggt gtc agc agc cga agc      283
Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Gly Val Ser Ser Arg Ser
5                               10                               15                               20

ttc ttt tcg ttc ctt ggc gag gct ttt gat ggg gct cgg gac atg tgg      331
Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg Asp Met Trp
                               25                               30                               35

aga gcc tac tct gac atg aga gaa gcc aat tac atc ggc tca gac aaa      379
Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile Gly Ser Asp Lys
                               40                               45                               50

tac ttc cat gct cgg ggg aac tat gat gct gcc aaa agg gga cct ggg      427
Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys Arg Gly Pro Gly
                               55                               60                               65

ggt gcc tgg gct gca gaa gtg atc agc gat gcc aga gag aat atc cag      475
Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asp Ala Arg Glu Asn Ile Gln
70                               75                               80

aga ttc ttt ggc cat ggt gcg gag gac tcg ctg gct gat cag gct gcc      523
Arg Phe Phe Gly His Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala Asp Gln Ala Ala
85                               90                               95                               100

aat gaa tgg ggc agg agt ggc aaa gac ccc aat cac ttc cga cct gct      571
Asn Glu Trp Gly Arg Ser Gly Lys Asp Pro Asn His Phe Arg Pro Ala
                               105                               110                               115

ggc ctg cct gag aaa tac tga gcttctctt cactctgctc tcaggagatc      622
Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
                               120

tggctgtgag gccctcaggg cagggataca aagcggggag aggggtacaca atgggtatct      682
aataaatact taagaggtgg aatttgtgga aact      716

```

<210> 6
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> SAA1 humano

 <400> 6

5

ES 2 560 538 T3

Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20 25 30
 Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50 55 60
 Arg Gly Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asp Ala Arg
 65 70 75 80
 Glu Asn Ile Gln Arg Phe Phe Gly His Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85 90 95
 Asp Gln Ala Ala Asn Glu Trp Gly Arg Ser Gly Lys Asp Pro Asn His
 100 105 110
 Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115 120

<210> 7
 <211> 545
 5 <212> ADN
 <213> SSA2 humano

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (38)..(406)

<400> 7
 agggacccgc agctcagcta cagcacagat cagcacc atg aag ctt ctc acg ggc 55
 Met Lys Leu Leu Thr Gly
 1 5
 ctg gtt ttc tgc tcc ttg gtc ctg agt gtc agc agc cga agc ttc ttt 103
 Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Ser Val Ser Ser Arg Ser Phe Phe
 10 15 20
 tcg ttc ctt ggc gag gct ttt gat ggg gct cgg gac atg tgg aga gcc 151
 Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala Arg Asp Met Trp Arg Ala
 25 30 35
 tac tct gac atg aga gaa gcc aat tac atc ggc tca gac aaa tac ttc 199
 Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile Gly Ser Asp Lys Tyr Phe
 40 45 50
 cat gct cgg ggg aac tat gat gct gcc aaa agg gga cct ggg ggt gcc 247
 His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys Arg Gly Pro Gly Gly Ala
 55 60 65 70
 tgg gct gca gaa gtg atc agc aat gcc aga gag aat atc cag aga ctc 295

Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asn Ala Arg Glu Asn Ile Gln Arg Leu
 75 80 85
 aca ggc cgt ggt gcg gag gac tcg ctg gcc gat cag gct gcc aat aaa 343
 Thr Gly Arg Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala Asp Gln Ala Ala Asn Lys
 90 95 100
 tgg ggc agg agt ggc aga gac ccc aat cac ttc cga cct gct ggc ctg 391
 Trp Gly Arg Ser Gly Arg Asp Pro Asn His Phe Arg Pro Ala Gly Leu
 105 110 115
 cct gag aaa tac tga gcttctctt cactctgctc tcaggagacc tggctatgag 446
 Pro Glu Lys Tyr
 120
 gccctcgggg caggataca aagttagtga ggtctatgctc cagagaagct gagatatggc 506
 atataatagg catctaataa atgcttaaga ggtggaaaa 545

5 <210> 8
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> SAA2 humano

<400> 8
 Met Lys Leu Leu Thr Gly Leu Val Phe Cys Ser Leu Val Leu Ser Val
 1 5 10 15
 Ser Ser Arg Ser Phe Phe Ser Phe Leu Gly Glu Ala Phe Asp Gly Ala
 20 25 30
 Arg Asp Met Trp Arg Ala Tyr Ser Asp Met Arg Glu Ala Asn Tyr Ile
 35 40 45
 Gly Ser Asp Lys Tyr Phe His Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Ala Ala Lys
 50 55 60
 Arg Gly Pro Gly Gly Ala Trp Ala Ala Glu Val Ile Ser Asn Ala Arg
 65 70 75 80
 Glu Asn Ile Gln Arg Leu Thr Gly Arg Gly Ala Glu Asp Ser Leu Ala
 85 90 95
 Asp Gln Ala Ala Asn Lys Trp Gly Arg Ser Gly Arg Asp Pro Asn His
 100 105 110
 Phe Arg Pro Ala Gly Leu Pro Glu Lys Tyr
 115 120

10 <210> 9
 <211> 2024
 <212> ADN
 <213> CRP humano

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (105)..(779)

20 <400> 9

aaggcaagag atctaggact tctagcccct gaactttcag ccgaatacat cttttccaaa 60
ggagtggaatt caggcccttg tactactggc agcaggacgt gacc atg gag aag ctg 116
Met Glu Lys Leu
1
ttg tgt ttc ttg gtc ttg acc agc ctc tct cat gct ttt ggc cag aca 164
Leu Cys Phe Leu Val Leu Thr Ser Leu Ser His Ala Phe Gly Gln Thr
5 10 15 20
gac atg tcg agg aag gct ttt gtg ttt ccc aaa gag tcg gat act tcc 212
Asp Met Ser Arg Lys Ala Phe Val Phe Pro Lys Glu Ser Asp Thr Ser
25 30 35
tat gta tcc ctc aaa gca ccg tta acg aag cct ctc aaa ggc ttc act 260
Tyr Val Ser Leu Lys Ala Pro Leu Thr Lys Pro Leu Lys Ala Phe Thr
40 45 50
gtg tgc ctc cac ttc tac acg gaa ctg tcc tcg acc cgt ggg tac agt 308
Val Cys Leu His Phe Tyr Thr Glu Leu Ser Ser Thr Arg Gly Tyr Ser
55 60 65
att ttc tcg tat gcc acc aag aga caa gac aat gag att ctc ata ttt 356
Ile Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Arg Gln Asp Asn Glu Ile Leu Ile Phe
70 75 80
tgg tct aag gat ata gga tac agt ttt aca gtg ggt ggg tct gaa ata 404
Trp Ser Lys Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Thr Val Gly Gly Ser Glu Ile
85 90 95 100
tta ttc gag gtt cct gaa gtc aca gta gct cca gta cac att tgt aca 452
Leu Phe Glu Val Pro Glu Val Thr Val Ala Pro Val His Ile Cys Thr
105 110 115
agc tgg gag tcc gcc tca ggg atc gtg gag ttc tgg gta gat ggg aag 500
Ser Trp Glu Ser Ala Ser Gly Ile Val Glu Phe Trp Val Asp Gly Lys
120 125 130
ccc agg gtg agg aag agt ctg aag aag gga tac act gtg ggg gca gaa 548
Pro Arg Val Arg Lys Ser Leu Lys Lys Gly Tyr Thr Val Gly Ala Glu
135 140 145
gca agc atc atc ttg ggg cag gag cag gat tcc ttc ggt ggg aac ttt 596
Ala Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Phe Gly Gly Asn Phe
150 155 160
gaa gga agc cag tcc ctg gtg gga gac att gga aat gtg aac atg tgg 644
Glu Gly Ser Gln Ser Leu Val Gly Asp Ile Gly Asn Val Asn Met Trp
165 170 175 180
gac ttt gtg ctg tca cca gat gag att aac acc atc tat ctt ggc ggg 692
Asp Phe Val Leu Ser Pro Asp Glu Ile Asn Thr Ile Tyr Leu Gly Gly
185 190 195
ccc ttc agt cct aat gtc ctg aac tgg cgg gca ctg aag tat gaa gtg 740
Pro Phe Ser Pro Asn Val Leu Asn Trp Arg Ala Leu Lys Tyr Glu Val
200 205 210
caa ggc gaa gtg ttc acc aaa ccc cag ctg tgg ccc tga ggcccagctg 789
Gln Gly Glu Val Phe Thr Lys Pro Gln Leu Trp Pro
215 220
tgggtcctga aggtacctcc cggttttta caccgcatgg gccccagtc tctgtctctg 849
gracctccc cttttttaca ctgcatggtt cccacgtctc tgtctctggg cctttgttcc 909

```

cctatatgca ttgcaggcct gctccaccct cctcagcgcc tgagaatgga ggtaaagtgt 969
ctggtctggg agctcgtaa ctatgctggg aaacggtcca aaagaatcag aatttgaggt 1029
gttttgtttt cttttttatt tcaagrtgga cagatcttgg agataatttc ttacctcaca 1089
tagatgagaa aactaacacc cagaaaggag aatgatggtt ataaaaaact cataaggcaa 1149
gagctgagaa ggaagcgtg atcttctatt taattcccca cccatgacct ccagaaagca 1209
ggagggcatt gcccacattc acagggctct tcagtctcag aatcaggaca ctggccaggt 1269
gtctggttg ggtccagagt gctcatcatc atgtcataga actgctgggc ccaggtctcc 1329
tgaaatggga agcccagcaa taccacgcag tccctccact ttctcaaagc aactggaaa 1389
ggccattaga attgccccag cagagcagat ctgctttttt tccagagcaa aatgaagcac 1449
taggtataaa tatgttgta ctgccaaaga cttaaataac tggtttttgt ttgcttgcag 1509
tgctttctta attttatggc tcttctggga aactcctccc cttttccaca cgaaccttgt 1569
ggggctgtga attctttctt catccccgca tcccaatat acccaggcca caagagtgga 1629
cgtgaaccac aggggtgctt gtcagaggag cccatctccc atctcccag etccctatct 1689
ggaggatagt tggatagtta cgtgttccta gcaggaccaa ctacagtctt cccaaggatt 1749
gagttatgga ctttgggagt gagacatctt cttgctgctg gatttccaag ctgagaggac 1809
gtgaacctgg gaccaccagt agccatcttg tttgccacat ggagagagac tgtgaggaca 1869
gaagccaaac tggaaagtga ggagccaagg gattgacaaa caacagagcc ttgaccacgt 1929
ggagtctctg aatcagcctt gtctggaacc agatctacac ctggactgcc caggtctata 1989
agccaataaa gcccctgttt acttgaaaaa aaaaa 2024

```

<210> 10
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> CRP humano

5

```

<400> 10
Met Glu Lys Leu Leu Cys Phe Leu Val Leu Thr Ser Leu Ser His Ala
1 5 10 15
Phe Gly Gln Thr Asp Met Ser Arg Lys Ala Phe Val Phe Pro Lys Glu
20 25 30
Ser Asp Thr Ser Tyr Val Ser Leu Lys Ala Pro Leu Thr Lys Pro Leu
35 40 45
Lys Ala Phe Thr Val Cys Leu His Phe Tyr Thr Glu Leu Ser Ser Thr
50 55 60
Arg Gly Tyr Ser Ile Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Arg Gln Asp Asn Glu
65 70 75 80
Ile Leu Ile Phe Trp Ser Lys Asp Ile Gly Tyr Ser Phe Thr Val Gly
85 90 95

```

ES 2 560 538 T3

Gly ser Glu Ile Leu Phe Glu Val Pro Glu Val Thr Val Ala Pro Val
 100 105 110
 His Ile Cys Thr Ser Trp Glu Ser Ala Ser Gly Ile Val Glu Phe Trp
 115 120 125
 Val Asp Gly Lys Pro Arg Val Arg Lys Ser Leu Lys Lys Gly Tyr Thr
 130 135 140
 Val Gly Ala Glu Ala Ser Ile Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Ser Phe
 145 150 155 160
 Gly Gly Asn Phe Glu Gly Ser Gln Ser Leu Val Gly Asp Ile Gly Asn
 165 170 175
 Val Asn Met Trp Asp Phe Val Leu Ser Pro Asp Glu Ile Asn Thr Ile
 180 185 190
 Tyr Leu Gly Gly Pro Phe Ser Pro Asn Val Leu Asn Trp Arg Ala Leu
 195 200 205
 Lys Tyr Glu Val Gln Gly Glu Val Phe Thr Lys Pro Gln Leu Trp Pro
 210 215 220

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que contiene un principio activo, en donde el principio activo es una cantidad eficaz de amiloide A de suero (SAA) solo o un fragmento activo del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas aumentando la actividad de células supresoras de origen mieloide (MDSC), en donde las enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas son enfermedades autoinflamatorias o enfermedades autoinmunitarias con componentes autoinmunitarios o enfermedades autoinmunitarias incluyendo EII, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, rechazo a trasplante, enfermedad del injerto contra el huésped o del huésped contra el injerto, enfermedades inflamatorias locales y sistémicas, un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, septicemia grave, choque séptico, síndrome de disfunción multiorgánica, síndrome de insuficiencia de múltiples órganos y rechazo a trasplante agudo.
- 15 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 que contiene un principio activo, en donde el principio activo es una cantidad eficaz de SAA o fragmento activo del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la reducción, mejora, o terminación de una respuesta inflamatoria o ralentización de la propagación o intensificación adicional de inflamación o una enfermedad asociada con enfermedades o afecciones inflamatorias desreguladas aumentando la actividad de MDSC.
- 20 3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2 en donde el principio activo es un péptido invariable en la posición 33-43 de SAA.
- 25 4. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además aditivos o sustancias auxiliares farmacéuticas y, preferiblemente, un soporte, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
5. Una cantidad eficaz de SAA solo o fragmentos activos del mismo o sales farmacéuticamente aceptables del mismo para su uso en el tratamiento de septicemia.

Figura 1

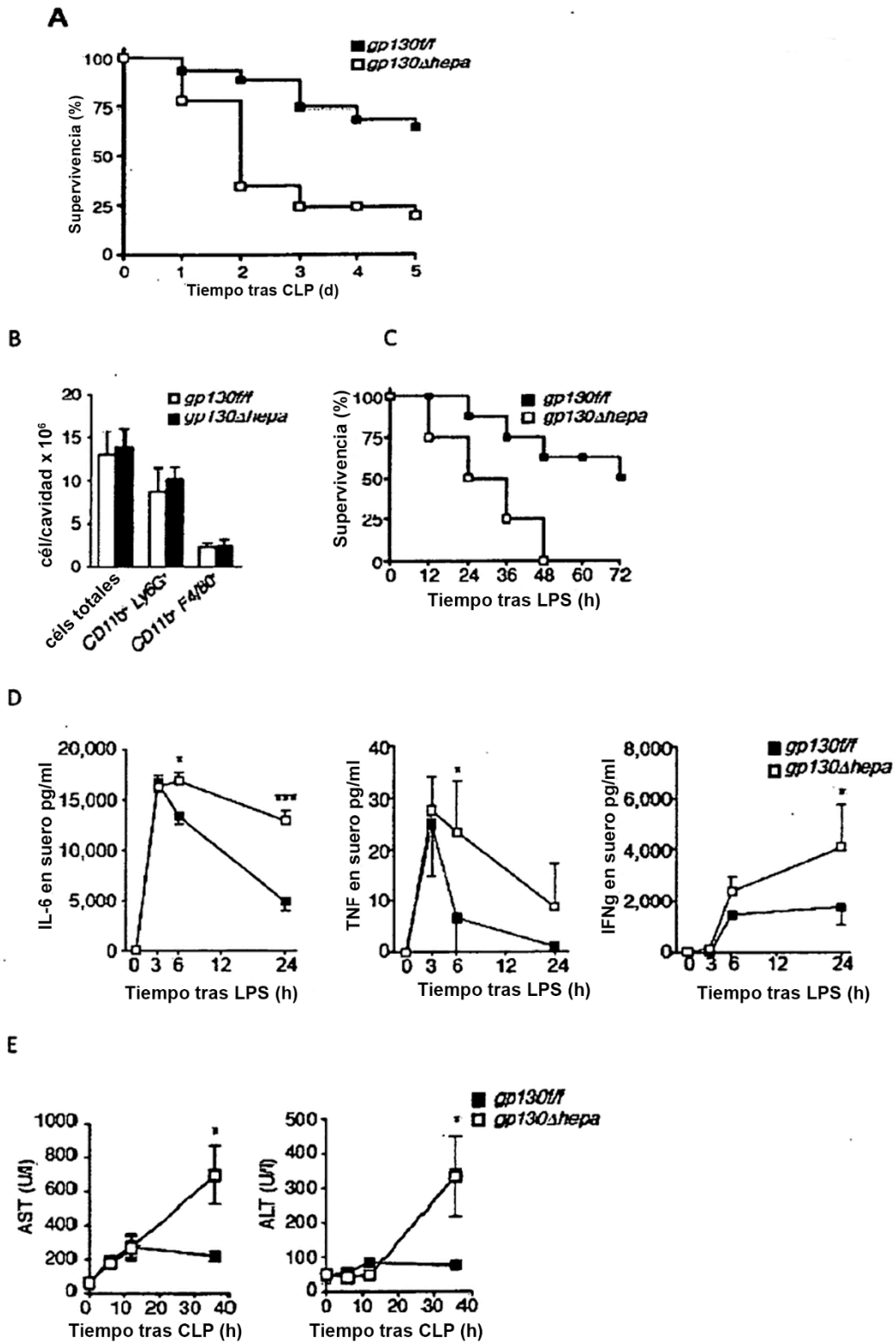


Figura 2

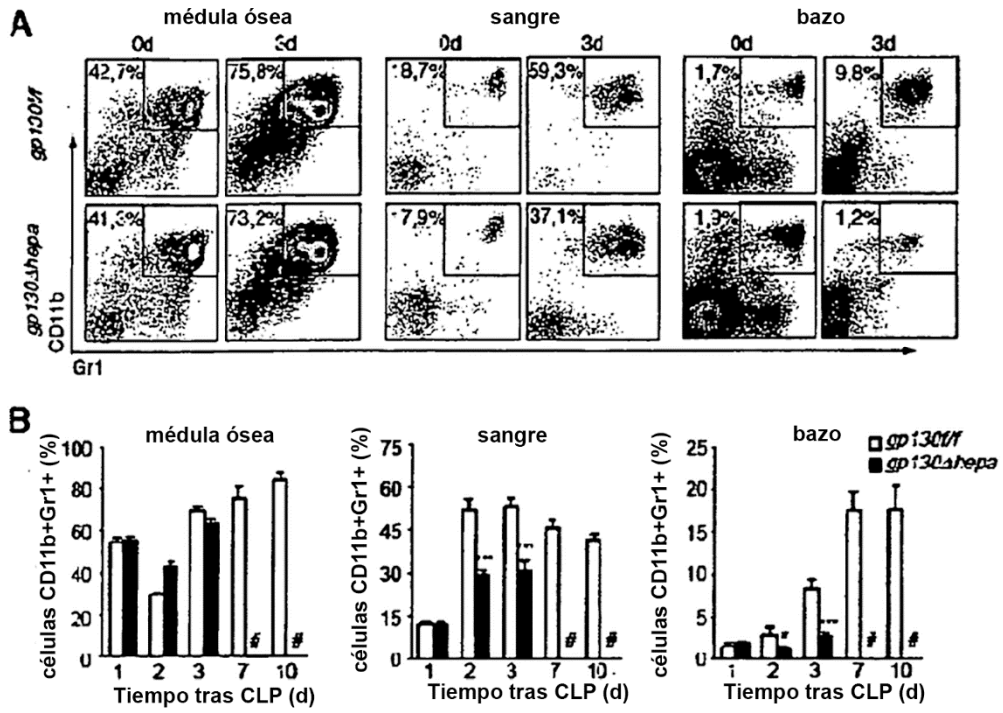


Figura 4

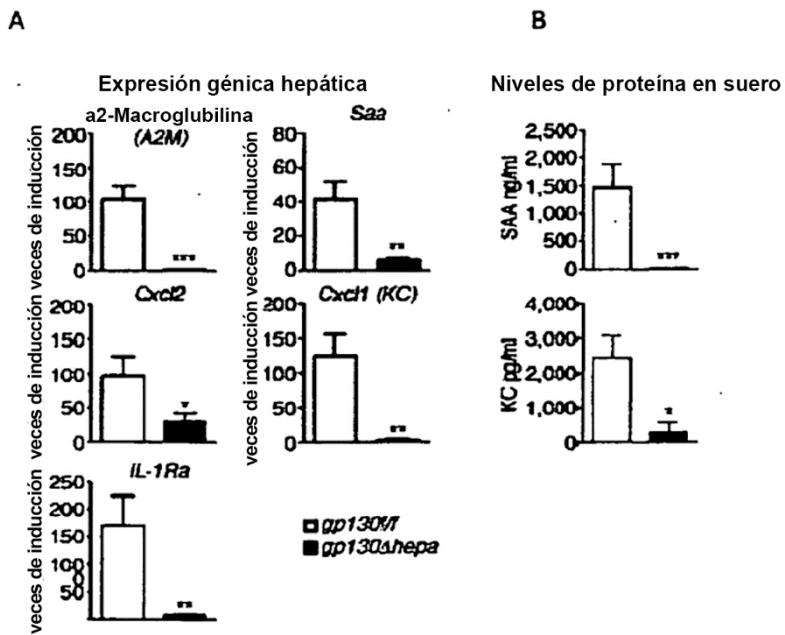


Figura 3

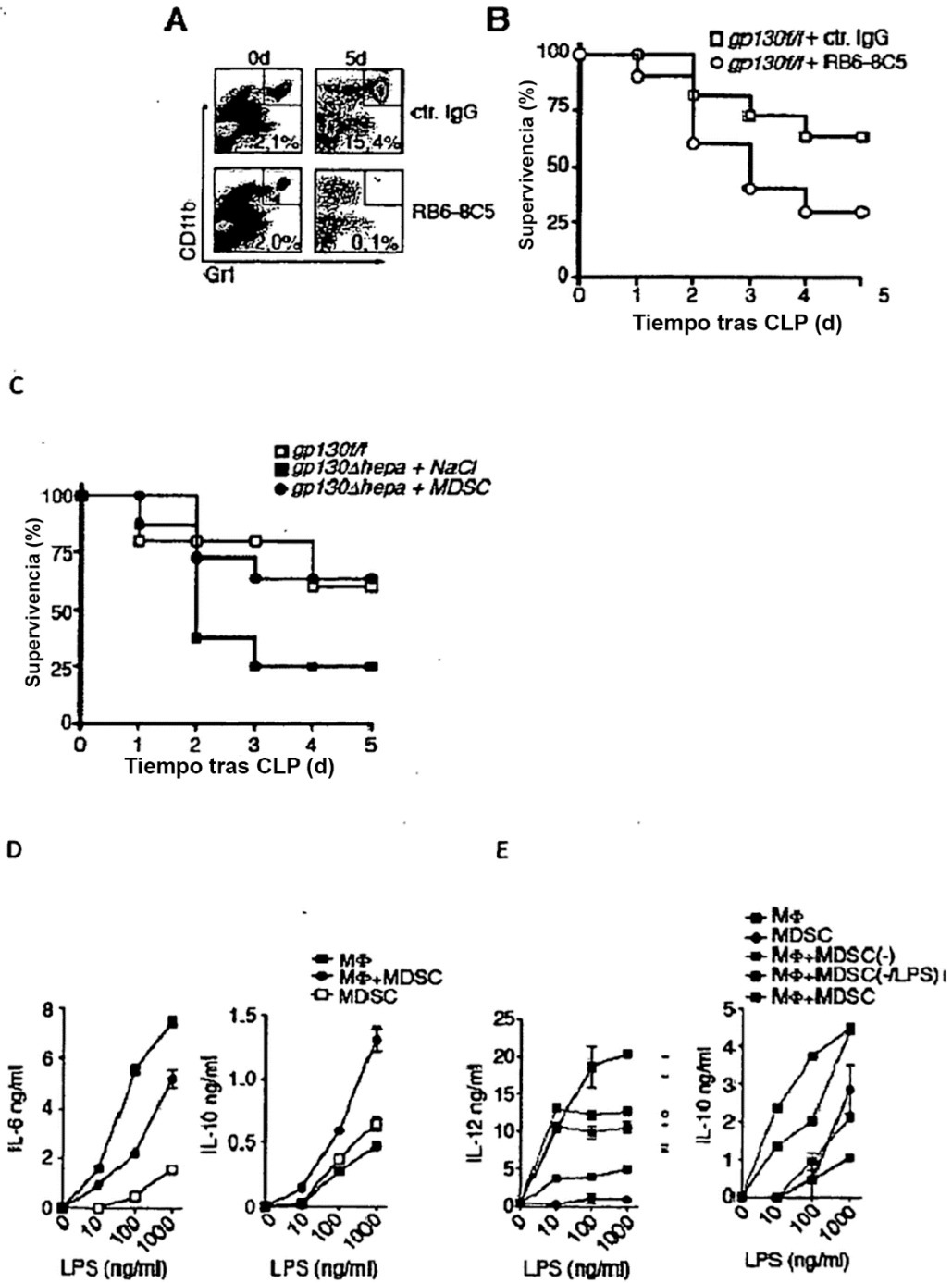


Figura 5

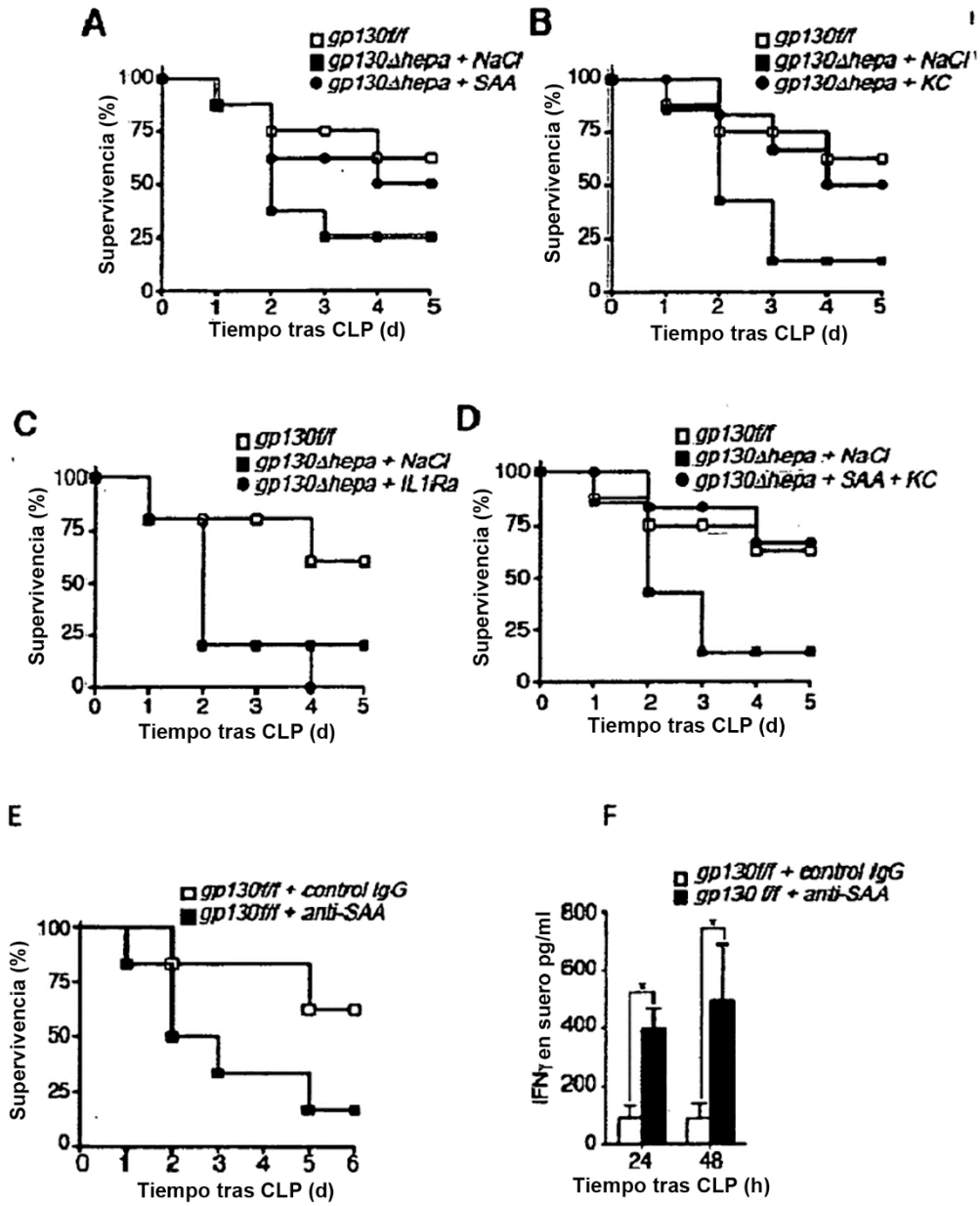


Figura 6

