(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 637 286**

(51) Int. CI.:

***A61K 38/17*** (2006.01)
***C07K 14/47*** (2006.01)
***A61K 9/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2012 PCT/EP2012/063137**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13007596**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2012 E 12746034 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2729159**

(54) Título: **Tratamiento oral de la enfermedad inflamatoria intestinal**

(30) Prioridad:

**08.07.2011 EP 11173351**
**11.07.2011 US 201161506437 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**11.10.2017**

(73) Titular/es:

**DEFENSIN THERAPEUTICS APS (100.0%)**
**Ole Maaloesvej 3**
**2200 København N, DK**

(72) Inventor/es:

**MARIA ROSENKILDE KJÆR, TANJA;**
**ANDERSEN, BIRGITTE y**
**SIDELMANN BRINCH, KAROLINE**

(74) Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

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

Tratamiento oral de la enfermedad inflamatoria intestinal

**Campo técnico**

La presente divulgación se refiere al mantenimiento de un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria intestinal en remisión mediante la administración oral de una beta defensina de mamífero a dicho sujeto en remisión.

**Antecedentes**

Defensinas humanas

Entre muchos otros elementos, son componentes clave de la inmunidad innata los péptidos antimicrobianos (los PAM) que de forma individual muestran una considerable selectividad, pero de forma colectiva tienen la capacidad de destruir rápidamente un amplio espectro de bacterias, virus y hongos. La importancia biológica de los PAM está enfatizada por su distribución ubicua en la naturaleza y probablemente lo producen todos los organismos multicelulares. En los seres humanos, los PAM predominantes son las defensinas. Las defensinas humanas son pequeños péptidos catiónicos que pueden dividirse en α- y β-defensinas basándose en la topología de sus tres enlaces disulfuro de cisteínas intramoleculares. Las α-defensinas pueden adicionalmente subdividirse en las que se aislaron en primer lugar a partir de gránulos de neutrófilos (HNP1-4) y las que expresan las células de Paneth en las criptas del intestino delgado (HD5 y HD6). Las β-defensinas se producen principalmente en las células epiteliales en diversos tejidos y órganos que incluyen la piel, la tráquea, el tracto gastrointestinal, el sistema urogenital, los riñones, el páncreas y las glándulas mamarias. Los miembros mejor caracterizados de la familia de las β-defensinas son hBD1-3. Sin embargo, utilizando diversas herramientas bioinformáticas se han anotado casi 40 fases de lectura abierta que codifican supuestos homólogos de la β-defensina en el genoma humano. Algunas de las defensinas humanas se producen de forma constitutiva, mientras que otras están inducidas por citocinas proinflamatorias o productos microbianos exógenos.

Se ha hecho cada vez más claro que las defensinas humanas, además de su actividad antimicrobiana directa, también tienen un amplio intervalo de propiedades inmunomoduladoras/alternativas. Estas incluyen la inducción de diversas quimiocinas y citocinas, actividades quimiotácticas y apoptóticas, la inducción de las prostaglandinas, la liberación de histamina y de leucotrienos, la inhibición del complemento, la estimulación de la maduración de las células dendríticas a través de la señalización del receptor de tipo toll y la estimulación de la eliminación de patógenos por neutrófilos. Además, las defensinas humanas también desempeñan un papel en la cicatrización, la proliferación de las células epiteliales y fibroblastos, la angiogénesis y la vasculogénesis.

Existen pruebas crecientes de que las defensinas humanas desempeñan un papel importante en muchas enfermedades infecciosas e inflamatorias. En la piel inflamada y/o infectada se observa a menudo la expresión aumentada de las defensinas humanas debido muy probablemente a la inducción local por parte de componentes microbianos o de citocinas proinflamatorias endógenas. En la psoriasis, hBD2 y hBD3 son muy abundantes y en el epitelio de las lesiones de pacientes con acné vulgar o foliculitis superficial se ha observado una regulación positiva de hBD2 significativa. Por otro lado, la regulación negativa de hBD2 y hBD3 se ha asociado con la dermatitis atópica. La enfermedad de Crohn Ileal se ha asociado con una expresión deficiente de HD5 y HD6, y en la enfermedad de Crohn en el colon la expresión de hBD2-4 está regulada de forma negativa.

Enfermedades Inflamatorias Intestinales

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) se definen por una inflamación intestinal crónica, recidivante, de origen desconocido. EII se refiere a dos trastornos distintos, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU). Ambas enfermedades parecen ser el resultado de una activación descontrolada de una respuesta inflamatoria en el intestino. Se piensa que esta cascada inflamatoria se perpetúa a través de acciones de las citocinas proinflamatorias y la activación selectiva de subpoblaciones de linfocitos. En pacientes con EII, las úlceras y la inflamación de la mucosa interna del intestino conducen a síntomas de dolor abdominal, diarrea y hemorragia del recto. La colitis ulcerosa se produce en el intestino grueso, mientras que en la enfermedad de Crohn, la enfermedad puede implicar el tracto GI, así como el intestino delgado y el grueso. Para la mayoría de los pacientes, la EII es una afección crónica con síntomas que duran de meses a años. Es más común en adultos jóvenes pero puede aparecer a cualquier edad. Se encuentra en todo el mundo, pero es más común en los países industrializados tales como los Estados Unidos, Inglaterra y el norte de Europa. Es especialmente común en personas entre la descendencia judía y su incidencia también tiene diferencias raciales. Estudios recientes han identificado variaciones de genes específicos, que incluyen ATG16L1, IL23R, IRGM y NOD2, que influyen en el riesgo de desarrollar enfermedad de Crohn. Se han identificado hasta 30 genes humanos que contribuyen a la susceptibilidad a la colitis ulcerosa.

Los síntomas clínicos de la EII son la hemorragia rectal intermitente, dolor abdominal de tipo cólico, la pérdida de peso y la diarrea. El diagnóstico de la EII se basa en los síntomas clínicos, el uso de un enema opaco, pero la visualización directa (la sigmoidoscopia o colonoscopia) es la prueba más precisa. La EII prolongada es un factor de

riesgo para el cáncer de colon y el tratamiento de la EII puede implicar la medicación y la cirugía.

Algunos pacientes con CU solo tienen enfermedad en el recto (proctitis). Otros con CU tienen una enfermedad limitada al recto y al colon izquierdo adyacente (proctosigmoiditis). Sin embargo, otros tienen CU en todo el colon (EII universal). Los síntomas de CU en general son más graves con una enfermedad más extensa (una parte más grande del colon implicada en la enfermedad).

El pronóstico de los pacientes con enfermedad limitada al recto (proctitis) o CU limitada al final del colon izquierdo (proctosigmoiditis) es mejor que el de la CU del colon completo. Pueden ser suficientes los tratamientos periódicos breves utilizando medicamentos orales o enemas. En los que tienen una enfermedad más extensa, la pérdida de sangre en el intestino inflamado puede conducir a la anemia, y puede requerir el tratamiento con complementos de hierro o incluso transfusiones de sangre. De forma poco frecuente el colon puede dilatarse de forma aguda hasta un gran tamaño cuando la inflamación se hace muy grave. Esta afección se denomina megacolon tóxico. Los pacientes con megacolon tóxico están extremadamente enfermos, con fiebre, dolor y distensión abdominal, deshidratación y malnutrición. A menos que el paciente mejore rápidamente con la medicación, habitualmente es necesaria la cirugía para evitar la rotura del colon.

La enfermedad de Crohn puede producirse en todas las regiones del tracto gastrointestinal. En esta enfermedad, se produce obstrucción intestinal debida a inflamación y a la fibrosis en un gran número de pacientes. Los granulomas y la formación de fístulas son complicaciones frecuentes de la enfermedad de Crohn. Las consecuencias de la progresión de la enfermedad influyen la alimentación intravenosa, la cirugía y la colostomía.

La EII puede tratarse con medicamentos. Los medicamentos más comúnmente utilizados para tratar la EII son los fármacos antiinflamatorios tales como los salicilatos. Las preparaciones de salicilato han sido eficaces en el tratamiento de la enfermedad leve a moderada. También pueden reducir la frecuencia de los recrudecimientos de la enfermedad cuando los medicamentos se toman en forma prolongada. Los ejemplos de salicilatos incluyen sulfasalazina, azulfidina, olsalazina y mesalamina. Todos estos medicamentos se proporcionan por vía oral en altas dosis para un máximo beneficio terapéutico. Estos medicamentos no están exentos de efectos secundarios. La azulfidina puede provocar malestar estomacal cuando se toma en altas dosis y en casos raros se ha descrito una inflamación leve del riñón con algunas preparaciones de salicilato.

En el tratamiento de la EII, los corticosteroides son más potentes y de acción más rápida que los salicilatos, pero los efectos secundarios potencialmente graves limitan el uso de los corticosteroides para pacientes con una enfermedad más grave. Habitualmente se producen efectos secundarios de los corticosteroides con el uso prolongado. Incluyen la osteopenia y el adelgazamiento de la piel, la susceptibilidad aumentada a infecciones, diabetes, hipertensión, glaucoma, atrofia/debilidad muscular, redondeo de la cara, alteraciones psiquiátricas y, en raras ocasiones, la destrucción de las articulaciones de la cadera.

En los pacientes con EII que no responden a los salicilatos o los corticosteroides, se utilizan medicamentos que suprimen el sistema inmunitario. Los ejemplos de inmunosupresores incluyen azatioprina y 6-mercaptopurina. Los inmunosupresores utilizados en esta situación ayudan a controlar la EII y permiten la reducción gradual o eliminación de los corticosteroides. Sin embargo, los inmunosupresores vuelven al paciente inmunocomprometido y lo hacen susceptible a muchas otras enfermedades.

Un modelo muy reconocido para el estudio de la EII es el modelo de ratón de colitis DSS, como se describe en Kawada *et al.* “Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease”, World J. Gastroenterol., Vol. 13 (42), pág. 5581-5593 (2007); y Wirtz y Neurath “Mouse models of inflammatory bowel disease”, Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 59 10 (11), 1073-1083 (2007)

El tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) tradicionalmente se ha llevado a cabo con la administración de aminosalicilatos, corticosteroides, tiopurinas, metotrexato y agentes antifactor de necrosis tumoral. Durante mucho tiempo se ha creído que las betas defensinas humanas desempeñan un papel en la aparición y/o el tratamiento de la EII.

Claramente existe una gran necesidad de agentes que tengan la capacidad de prevenir y tratar la EII.

El documento WO 2007/081486 divulga el uso de varias defensinas humanas en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Los inventores sugirieron que las defensinas administradas por vía oral a pacientes de Crohn, en una formulación que permite su liberación en emplazamientos apropiados en la luz intestinal, reducirían la cantidad de bacterias invasoras, restablecerían una función normal de la barrera epitelial y, por tanto, reducirían la gravedad de la enfermedad inflamatoria.

De acuerdo con el documento WO 2007/081486, la función de las defensinas es dirigirse de forma directa y destruir bacterias en la luz para impedirles invadir el tejido epitelial. Es decir, la función de las defensinas es puramente como compuesto antiinfeccioso.

**Sumario de la invención**

La presente divulgación demuestra una actividad antiinflamatoria de hBD2 administrada por vía oral en el modelo de colitis DSS inducido en ratón tras un período de tratamiento de 10 días.

Estos datos indican el efecto beneficioso del tratamiento de la EII asociado con la administración oral o parenteral simultánea o sucesiva de una beta defensina de mamífero.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una beta defensina de mamífero para su uso en el mantenimiento de un individuo que padece una enfermedad inflamatoria intestinal en remisión, comprendiendo el procedimiento la administración oral de dicha beta defensina de mamífero a dicho sujeto en remisión.

En pacientes que padecen EII puede aparecer de vez en cuando un recrudecimiento agudo de los síntomas originales; esto se conoce como una "recaída". Dependiendo de las circunstancias, puede desaparecer por sí solo o puede necesitar medicación. El tiempo entre la recaída puede ser de semanas a años, y varía entre pacientes. La administración oral de una beta defensina de mamífero reduce la aparición de una recaída en un sujeto que padece una EII.

Como se describe en la sección de definiciones de la presente solicitud, las EII son un grupo de afecciones inflamatorias del colon y del intestino delgado. Los tipos principales de EII son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU). En una realización preferente de la presente divulgación, la EII a tratar es enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa leve activa y/o moderada a grave.

**Descripción de los dibujos**

Figura 1. Evolución de la puntuación del índice de actividad de la enfermedad (IAE) (con peso corporal) durante el estudio. Los resultados se muestran como la media ± el error típico de la media para n=10 animales por grupo. Las diferencias significativas a partir de los valores del grupo de control (vehículo) en una fecha dada se muestran como *P<0,05; **P<0,01 ***P <0,001 (Prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos).

Figura 2. Puntuación histológica de muestras de colon proximal. Los resultados se muestran como la media ± el error típico de la media para n=10 animales por grupo. Las diferencias significativas a partir de los valores del grupo de control (vehículo) se muestran como **P<0,01; ***P <0,001 (Prueba de Kruskal-Wallis + posprueba de Dunn para datos no paramétricos).

Figura 3. Puntuación histológica de las muestras de colon distal. Los resultados se muestran como la media ± el error típico de la media para n=10 animales por grupo. Las diferencias significativas a partir de los valores del grupo de control (vehículo) se muestran como **P<0,01 (Prueba de Kruskal-Wallis + posprueba de Dunn para datos no paramétricos).

Figura 4. Múltiple alineamiento de secuencias de Clustal W (2.1) de la beta defensina 2 de ser humano, macaco Rhesus, chimpancé y orangután.

* Indica posiciones que tienen un resto único, totalmente conservado.
: Indica que uno de los siguientes grupos “fuertes” está totalmente conservado:
STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW.
. Indica que uno de los siguientes grupos “más débiles” está totalmente conservado:
-CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, VLIM, HFY.

Figura 5. El alineamiento de múltiples secuencias de Clustal W (2.1) de la defensina humana 1-4.

* Indica posiciones que tienen un resto único, completamente conservado.
: indica que uno de los siguientes grupos “fuertes” está totalmente conservado:
-STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW.
. Indica que uno de los siguientes grupos “más débiles” está totalmente conservado:
-CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, VLIM, HFY.

**Descripción detallada**

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

**Definiciones:**

Defensina: El término "defensina" como se utiliza en el presente documento se refiere a polipéptidos que un experto en la materia reconoce que pertenecen a la clase de las defensinas de los péptidos antimicrobianos. Para determinar si un polipéptido es una defensina de acuerdo con la divulgación, la secuencia de aminoácidos puede

compararse con los perfiles del modelo oculto de markov (perfiles MOM) de la base de datos PFAM utilizando el paquete de programas informáticos de uso libre HMMER.
Las familias de defensinas de PFAM incluyen, por ejemplo, Defensina_1 o "Defensina de Mamífero" (número de referencia PF00323), y Defensina_2 o Defensina_beta o "Beta Defensina" (número de referencia PF00711).

Las defensinas de la divulgación pertenecen a la clase de las beta defensinas. Las defensinas de la clase de las betas defensinas comparten características estructurales comunes conocidas para el experto en la materia, tal como el patrón de cisteínas.

Los ejemplos de defensinas, de acuerdo con la divulgación, incluyen la beta defensina humana 1 (hBD1; véase SEQ ID NO: 1), beta defensina 2 humana (hBD2, véase SEQ ID NO: 2), beta defensina humana 3 (hBD3; véase SEQ ID NO: 3), beta defensina humana 4 (hBD4, véase SEQ ID NO: 4), y beta defensina de ratón 3 (mBD3; véase SEQ ID NO: 6).

Identidad: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe como el parámetro "identidad".

Para los fines de la presente divulgación, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, se determina utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology 10 Open Software Suite, Rice et al., 2000, *Trends in Genetics* 16:276-277; http://emboss.org), preferentemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son penalización de apertura de hueco de 10, penalización de extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción –no breve) se utiliza como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente forma:
(Restos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento - Número total de huecos en el alineamiento)

Polipéptido aislado: La expresión "variante aislada" o "polipéptido aislado" como se utiliza en el presente documento se refiere a una variante o un polipéptido que se aísla de una fuente. En un aspecto de la presente divulgación, la variante o polipéptido está al menos el 1 % puro, preferentemente al menos el 5 % puro, más preferentemente al menos el 10 % puro, más preferentemente al menos el 20 % puro, más preferentemente al menos el 40 % puro , más preferentemente al menos el 60 % puro, aún más preferentemente al menos el 80 % puro y muy preferentemente al menos el 90 % puro, como se determina por análisis de RP-HPLC.

Polipéptido sustancialmente puro: La expresión "polipéptido sustancialmente puro" denota en el presente documento una preparación de polipéptido que contiene como máximo el 10 %, preferentemente como máximo el 8 %, más preferentemente como máximo el 6 %, más preferentemente como máximo el 5 %, más preferentemente como máximo el 4 %, más preferentemente como máximo el 3 %, aún más preferentemente como máximo el 2 %, más preferentemente como máximo el 1 %, y aún más preferentemente como máximo el 0,5 % en peso del otro material polipeptídico con el cual está asociado de forma nativa o recombinante. Por lo tanto, es preferente que el polipéptido sustancialmente puro esté al menos el 92 % puro, preferentemente al menos el 94 % puro, más preferentemente al menos el 95 % puro, más preferentemente al menos el 96 % puro, más preferentemente al menos el 96 % puro, más preferentemente al menos el 97 % puro, más preferentemente al menos el 98 % puro, aún más preferentemente al menos el 99 %, muy preferentemente al menos el 99,5 % puro y aún más preferentemente el 100 % puro en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente divulgación están preferentemente en una forma sustancialmente pura. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o mediante métodos de purificación clásicos o mediante síntesis química.

Remisión: El término "remisión" denota en el presente documento períodos con control de la enfermedad frente a enfermedad activa que a menudo se denominan como un "ataque".

Recaída: El término "recaída" denota en el presente documento una reaparición de los síntomas de la EII. Los síntomas tempranos más comunes de la EII son la diarrea crónica (que a veces es hemorrágica), dolor abdominal de tipo cólico, fiebre, pérdida del apetito y pérdida de peso. Los síntomas pueden continuar durante días o semanas y pueden resolverse sin tratamiento. La recaída de la EII se produce a intervalos irregulares a lo largo de toda la vida de un sujeto. La recaída puede ser leve o grave, breve o prolongada. Las recaídas graves pueden conducir a dolor intenso, deshidratación y pérdida de sangre.

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII): la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de afecciones inflamatorias del colon y del intestino delgado. Los tipos principales de EII son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (CU).

Representando muchos menos casos están otras formas de la EII, las cuales no siempre se clasifican como EII típica:

- Colitis colágena
- Colitis linfocítica
- Colitis isquémica
- Colitis por desviación
- Enfermedad de Behçet
- Colitis indeterminada

La principal diferencia entre la enfermedad de Crohn y la CU es el “emplazamiento” y la “naturaleza” de los cambios inflamatorios. Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano (lesiones discontinuas), aunque una mayoría de los casos comienzan en el íleon terminal. La colitis ulcerosa, por el contrario, se restringe al colon y al recto.

Tratamiento: Las expresiones "tratamiento" y "que trata" como se utilizan en el presente documento se refieren al tratamiento y cuidado de un paciente con el fin de combatir una afección, enfermedad o trastorno. Se pretende que el término incluya el amplio espectro de tratamientos para una dada afección que padece el paciente, tal como la administración del compuesto activo con el fin de: aliviar o mitigar los síntomas o complicaciones; retrasar la evolución de la afección, enfermedad o trastorno; curar o eliminar la afección, enfermedad o trastorno; y/o prevenir la afección, enfermedad o trastorno, en los que "que previene" o "prevención" debe entenderse que se refieren al tratamiento y el cuidado de un paciente con el fin de dificultar, reducir o retrasar desarrollo de la afección, enfermedad o trastorno, e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir o reducir el riesgo del inicio de los síntomas o las complicaciones. El paciente para tratar es preferentemente un mamífero, en particular un ser humano. Los pacientes para tratar de acuerdo con la presente divulgación pueden ser de diversas edades.

**Beta defensinas de mamífero**

La presente divulgación se refiere a los usos farmacéuticos de las beta defensinas de mamíferos, tales como las beta defensinas de ratón, mono o ser humano, más preferentemente las beta defensinas de los homínidos, más preferentemente la beta defensina humana, en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales, tales como la colitis ulcerosa y/o la enfermedad de Crohn.

En una realización de la presente divulgación, las beta defensinas de mamífero de la divulgación tienen un grado de identidad de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 % y muy preferentemente al menos el 95 % con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y/o SEQ ID NO: 6. En una realización preferente de la presente divulgación, las beta defensinas de mamíferos de la divulgación tienen un grado de identidad de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 % y muy preferentemente al menos el 95 % con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 4. En una realización más preferente de la presente divulgación, las beta defensinas de mamífero de la presente divulgación consisten en la beta defensina humana 1(SEQ ID NO: 1), la beta defensina humana 2 (SEQ ID NO: 2), la beta defensina humana 3 (SEQ ID NO: 3), beta defensina humana 4 (SEQ ID NO: 4), una variante de la beta defensina humana 4 (SEQ ID NO: 5) y/o la beta defensina de ratón 3 (SEQ ID NO: 6). En una realización aún más preferente de la presente divulgación, las beta defensinas de mamífero de la presente divulgación consisten en la beta defensina humana 1 (SEQ ID NO: 1), la beta defensina humana 2 (SEQ ID NO: 2), la beta defensina humana 3 (SEQ ID NO: 3) y/o la beta defensina humana 4 (SEQ ID NO: 4).

En una realización preferente de la presente divulgación, las beta defensinas de mamífero de la presente divulgación tienen un grado de identidad de al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 % y muy preferentemente al menos el 95 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En una realización preferente de la presente divulgación, las beta defensinas de mamífero de la presente divulgación consisten en la beta defensina humana 2 (SEQ ID NO: 2).

En aún otra realización de la presente divulgación, las beta defensinas de mamífero de la presente divulgación consisten en las beta defensinas humanas y/o las beta defensinas de ratón y variantes funcionalmente equivalentes de las mismas. Preferentemente, las beta defensinas de mamífero consisten en la beta defensina humana 1, la beta defensina humana 2, la beta defensina humana 3, la beta defensina humana 4, la beta defensina de chimpancé 2, la beta defensina de macaco 2 y la beta defensina de ratón 3, y variantes funcionalmente equivalentes de las mismas. Más preferentemente, las beta defensinas de mamífero de la presente divulgación consisten en la beta defensina humana 2, y variantes funcionalmente equivalentes de la misma.

Las beta defensinas de mamífero de la presente divulgación también se denominan compuestos de las realizaciones preferentes de la presente divulgación.

En el contexto de la presente divulgación, una "variante funcionalmente equivalente" de una beta defensina de mamífero (p. ej., ser humano) es una beta defensina de mamífero modificada (p. ej., humana) que presenta aproximadamente el mismo efecto sobre una enfermedad inflamatoria intestinal que la beta defensina de mamífero parental (p. ej., humana). Preferentemente, también presenta aproximadamente el mismo efecto sobre la actividad

de las citocinas y quimiocinas proinflamatorias y/o citocinas antiinflamatorias que la beta defensina de mamífero (p. ej., ser humano). En una realización de la presente divulgación, el efecto sobre la actividad de las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias se mide como se describe en el documento WO 2010/007166, en los Ejemplos 4 y 6. El efecto puede medirse en una célula humana seleccionada del grupo que consiste en CMSP humanas, células dendríticas derivadas de monocitos CD14+ humanas, una línea celular de monocitos humana y células dendríticas inmaduras humanas, preferentemente CMSP humanas.

De acuerdo con la presente divulgación, una variante funcionalmente equivalente de un beta defensina de mamífero (p. ej., ser humano) puede comprender 1-5 modificaciones de aminoácido, preferentemente 1-4 modificaciones de aminoácido, más preferentemente 1-3 modificaciones de aminoácido, muy preferentemente 1-2 modificación (o modificaciones) de aminoácido y en particular una modificación de aminoácido, comparada con la secuencia de aminoácidos de la beta defensina de mamífero (p. ej., ser humano). Preferentemente, comparada con la beta defensina humana 2, que tiene la SEQ ID NO: 2.

El término "modificación" significa en el presente documento cualquier modificación química de una beta defensina de mamífero (p. ej., ser humano). La modificación (o modificaciones) puede ser una sustitución (o sustituciones), una deleción (o deleciones) y/o una inserción (o inserciones) del aminoácido (o aminoácidos), así como el reemplazo (o reemplazos) de la cadena (o cadenas) lateral del aminoácido; o el uso de aminoácidos no naturales con características similares en la secuencia de aminoácidos. En particular, la modificación (o modificaciones) pueden ser amidaciones, tales como la amidación del extremo C.

Preferentemente, las modificaciones de aminoácidos son de naturaleza menor, es decir sustituciones o inserciones de aminoácido conservativas que no afectan de forma significativa al plegamiento y/o la actividad del polipéptido; deleciones únicas; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales; o una pequeña extensión que facilite la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como una etiqueta de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión. En una realización de la presente divulgación, la pequeña extensión, tal como una etiqueta de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión, está unido a la beta defensina de mamífero (p. ej., ser humano) a través de un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 restos y dicho enlazador puede contener un sitio de escisión para una enzima de restricción. El alineamiento de Clustal W en la Figura 4 o la Figura 5 puede utilizarse para predecir qué restos de aminoácidos pueden sustituirse sin afectar de forma sustancial a la actividad biológica de la proteína. Las secuencias se alinearon utilizando Clustal W 2.1 (http://www.genome.ip/tools/clustalw/) y los siguientes parámetros: Penalización de apertura de hueco: 10, Penalización de extensión de hueco: 0,05, Transición de Peso: NO, Restos Hidrófilos para proteínas: GPSNDQE, Huecos Hidrófilos: SÍ,
Matriz de peso: BLOSUM (para PROTEIN).

Las sustituciones dentro del siguiente grupo (Clustal W, grupo de conservación “fuerte”) deben considerarse sustituciones conservativas dentro del significado de la presente divulgación
-STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW.

Las sustituciones dentro del siguiente grupo (Clustal W, grupo de conservación "débil") deben considerarse sustituciones semiconservativas dentro del significado de la presente divulgación
-CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, VLIM, HFY.

Los ejemplos de sustituciones conservativas son sustituciones hechas dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Se conocen en la técnica sustituciones de aminoácidos que en general no alteran la actividad específica y se describen, por ejemplo, en H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, Nueva York. Los intercambios que se producen de forma más común son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

Además de los 20 aminoácidos convencionales, pueden sustituirse restos de aminoácidos de un polipéptido silvestre por aminoácidos no convencionales (tales como 4-hidroxiprolina, 6-*N*-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina). Pueden sustituirse restos de aminoácido por un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético y aminoácidos no naturales. Se han modificado “aminoácidos no naturales” tras la síntesis proteica y/o tienen una estructura química en su cadena (o sus cadenas) lateral distinta de la de los aminoácidos convencionales. Los aminoácidos no naturales pueden sintetizarse de forma química, preferentemente están disponibles en el mercado, e incluyen ácido pipecólico, ácido tiazolidincarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, y 3,3-dimetilprolina.

Los aminoácidos esenciales en una beta defensina de mamífero pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la materia, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de rastreo con alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244:1081-20 1085). En la última técnica, se introducen mutaciones de alaninas individuales en cada resto de la molécula y se analiza la actividad biológica de las moléculas mutantes resultantes

(es decir, la actividad frente a una enfermedad inflamatoria intestinal y/o la supresión de la actividad de TNF-alfa) para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también Hilton *et al*., 1996, J. Biol. Chem. 271:4699-4708. Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden inferirse a partir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con las beta defensinas de mamífero (véase el alineamiento de Clustal W en la Figura 4 y la Figura 5).

Las sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples pueden realizarse y analizarse utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguido de un procedimiento de exploración relevante, tal como los descritos en Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, 30 Science 241:53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156; el documento WO 95/17413; o el documento WO 95/22625. Otros métodos que pueden utilizarse incluyen la PCR propensa a errores, la presentación en fagos (p. ej., Lowman *et al*., 1991, Biochem 30:10832-10837, la Patente de Estados Unidos N.º 5.223.409, el documento WO 92/06204) y la mutagénesis dirigida a regiones (Derbyshire *Et al*., 1986, Gene 46:145, Ner *et al*., 1988, DNA 7:127).

Una extensión N-terminal de los polipéptidos de la presente divulgación puede consistir de forma adecuada en de 1 a 50 aminoácidos, preferentemente 2-20 aminoácidos, en especial 3-15 aminoácidos. En una realización de la presente divulgación la extensión peptídica N-terminal no contiene una Arg (R). En otra realización de la presente divulgación, la extensión N-terminal comprende un sitio de escisión de kex2 o de tipo kex2 como se definirá adicionalmente a continuación. En una realización preferente de la presente divulgación, la extensión N-terminal es un péptido, que comprende al menos dos restos de aminoácidos Glu (E) y/o Asp (D), tal como una extensión N terminal que comprende una de las siguientes secuencias: EAE, EE, DE y DD.

Cuando el resultado de una dada sustitución no pueda predecirse con certeza, los derivados pueden ensayarse fácilmente de acuerdo con los métodos descritos anteriormente en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de actividad biológica.

**Métodos y usos**

Se descubrió que la beta defensina humana 2 reduce de forma significativa la gravedad de parámetros de enfermedad en un modelo de colitis inducida por Dextrano Sulfato de Sodio (DSS) en ratón de diez días demostrando así la potente actividad como un medicamento para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales, tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento profiláctico de las enfermedades inflamatorias intestinales o como un método para mantener a un sujeto que padece EII en remisión, cuyo tratamiento comprende administrar por vía oral a un sujeto que necesite tal tratamiento una cantidad eficaz de una beta defensina de mamífero, tal como una beta defensina humana 2, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica.

Una realización de la presente divulgación se refiere a la prolongación de este período de remisión tras la administración oral de una beta defensina de mamífero o la reducción de la aparición de una recaída en un sujeto que padece EII.

Enfermedad intestinal inflamatoria de acuerdo con la presente divulgación se refiere a la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. En una realización preferente de la presente divulgación la fase de la Enfermedad de Crohn para tratar utilizando la administración oral de una beta defensina de mamífero es la enfermedad de Crohn en remisión y/o activa leve. En otra realización preferente de la presente divulgación, la fase de colitis ulcerosa para tratar utilizando la administración oral de una beta defensina de mamífero es colitis ulcerosa en fase de remisión (p. ej., pancolitis/remisión, colitis del lado izquierdo/remisión y enfermedad resistente a la terapia en remisión).

En una realización de la presente divulgación la administración oral de las beta defensinas de mamífero puede utilizarse para reducir la invasión de neutrófilos en el revestimiento epitelial del colon. Esta reducción puede emplazarse en el colon proximal o distal.

En otra realización de la presente divulgación, la administración oral de la beta defensina de mamífero puede utilizarse para el tratamiento de la inflamación del colon. En aún otra realización de la presente divulgación, la administración oral de una beta defensina de mamífero puede utilizarse para modular la producción de citocinas en la mucosa epitelial en el tracto gastrointestinal.

La modulación preferentemente es una regulación negativa de la actividad de al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Preferentemente, la modulación es una regulación negativa de la actividad de al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en los IL-23, IL-1β y TNFα proinflamatorios y/o una regulación positiva de la actividad de la citocina IL-10 antiinflamatoria.

En otra realización la presente divulgación proporciona métodos para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales, cuyo tratamiento comprende administrar de forma simultánea o sucesiva la administración

parenteral y oral de una cantidad eficaz de una beta defensina de mamífero en forma de una composición farmacéutica. Durante un brote activo ("ataque") de una enfermedad intestinal inflamatoria, el sujeto que padece dicha EII puede, en una realización de la presente divulgación, someterse a la administración parenteral de una beta defensina de mamífero, tal como una beta defensina humana 2, combinada con o seguida de la administración oral de dicha beta defensina de mamífero durante los períodos de remisión.

En una realización de la presente divulgación, el método de tratamiento con hBD2 da como resultado una inhibición significativa del índice de actividad de la enfermedad (IAE) en un modelo *in vivo* de EII, cuando se administra dos veces al día, a un nivel de 3 dosis mediante la vía oral y hBD2 también ha demostrado una actividad antiinflamatoria muy significativa en el mismo modelo.

Las beta defensinas de mamífero pueden emplearse de forma terapéutica en composiciones formuladas para la administración mediante cualquier vía convencional. En una realización de la presente divulgación, las beta defensinas de mamífero se administran por vía oral.

En otra realización de la presente divulgación, las beta defensinas de mamífero se administran mediante administración oral y parenteral simultánea o sucesiva.

La administración oral normalmente es para el suministro entérico de fármacos, en la que el agente se suministra a través de la mucosa entérica.

La administración parenteral es cualquier vía de administración que no sea la ruta oral/entérica, por lo que el medicamento evita el efecto de primer paso hepático. Por consiguiente, la administración parenteral incluye cualquier inyección e infusión, por ejemplo la inyección en embolada o la infusión continua, tal como la administración intravenosa, la administración intramuscular, la administración subcutánea.

En general son preferentes las formas de administración parenteral subcutánea e intramuscular.

Dentro de aún otras realizaciones de la presente divulgación, las composiciones de realizaciones preferentes de la presente divulgación pueden formularse como un liofilizado, utilizando excipientes apropiados que proporcionan estabilidad como un liofilizado, y después de rehidratación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen una beta defensina de mamífero, tal como una beta defensina humana, pueden fabricarse de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, mediante procedimientos de mezcla, granulación, recubrimiento, disolución o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas de las realizaciones preferentes de la presente divulgación comprenden una beta defensina de mamífero, tal como una beta defensina humana, y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Los expertos en la materia están familiarizados con los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Para las composiciones formuladas como soluciones líquidas, los vehículos y/o diluyentes aceptables incluyen solución salina y agua estéril, y pueden incluir, de forma opcional, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y otros aditivos comunes.

La administración parenteral puede ser en forma de inyecciones e infusiones, y dichas formulaciones pueden tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones, en vehículos oleosos o acuosos. Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo, obtenerse por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización a partir de una solución para la constitución antes de su uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollas, viales, jeringas precargadas, bolsas de infusión o pueden almacenarse en un estado de congelación en seco (liofilizado) que necesita solo la adición de un excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso.

Los ejemplos de transportadores, diluyentes, disolventes o vehículos oleosos o no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

La composición de la presente divulgación puede formularse en una amplia diversidad de formulaciones para la administración oral. Las preparaciones en forma sólida pueden incluir polvos, comprimidos, gotas, cápsulas, obleas, pastillas para chupar y gránulos dispersables. Otras formas adecuadas para la administración oral pueden incluir preparaciones en forma líquida que incluyen emulsiones, jarabes, elixires, soluciones acuosas, suspensiones acuosas, pasta de dientes, dentífrico en gel, chicles o preparaciones en forma sólida que tienen por objetivo convertirse poco antes de su uso en preparaciones en forma líquida, tales como soluciones, suspensiones y emulsiones.

En los polvos, el transportador es un sólido finamente dividido que es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo está mezclado con el transportador, que tiene la capacidad de unión necesaria, en proporciones adecuadas y compactados en la forma y el tamaño deseados. Los transportadores adecuados son el carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares.

Las gotas, de acuerdo con la presente divulgación, pueden comprender soluciones o suspensiones acuosas u oleosas, estériles o no estériles, y pueden prepararse disolviendo el principio activo en una solución acuosa adecuada, de forma opcional incluyendo un agente bactericida y/o fúngico, y/o cualquier otro conservante adecuado, y de forma opcional incluyendo un tensioactivo. Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

Las emulsiones pueden prepararse en soluciones en soluciones acuosas de propilenglicol o pueden contener agentes emulsionantes tales como lecitina, monooleato de sorbitán o goma arábiga. Las soluciones acuosas pueden prepararse disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, saborizantes, estabilizantes y agentes espesantes.

Las suspensiones acuosas pueden prepararse dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y otros agentes de suspensión bien conocidos.

La formulación puede contener (además de un beta defensina de mamífero y otros principios activos optativos) transportadores, cargas, disgregantes, acondicionadores de flujo, azúcares y edulcorantes, fragancias, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica, tampones, diluyentes, agentes dispersantes y tensioactivos, aglutinantes, lubricantes y/u otros excipientes farmacéuticos conocidos en la técnica.

Un experto en la técnica puede formular adicionalmente las beta defensinas de mamífero de una manera apropiada, en conformidad con las prácticas aceptadas, tales como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1990.

Una beta defensina de mamífero, tal como una beta defensina humana, puede utilizarse sola, o en terapias de combinación con otros uno, dos o más compuestos farmacéuticos o sustancias farmacológicas, y/o con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

**Síntesis *in vitro***

Las beta defensinas de mamífero pueden prepararse mediante síntesis *in vitro*, utilizando métodos convencionales como se conoce en la técnica. Están disponibles diversos aparatos de síntesis comerciales, por ejemplo el sintetizador automatizado de Applied Biosystems Inc., Beckman, etc. Utilizando sintetizadores, pueden sustituirse los aminoácidos de origen natural por aminoácidos no naturales, en particular D isómeros (o formas D), por ejemplo D-alanina y D-isoleucina, diastereoisómeros, cadenas laterales que tienen distintas longitudes o funcionalidades, y similares. La secuencia particular y la manera de preparación se determinará según la conveniencia, la rentabilidad, la pureza requerida, y similares.

La unión química puede proporcionarse a diversos péptidos o proteínas que comprenden funcionalidades convenientes para el enlazamiento, tales como grupos amino para la formación de amidas o de aminas sustituidas, por ejemplo aminación reductora, grupos tiol para la formación de tioéter o disulfuros, grupos carboxilo para la formación de amida, y similares.

Si se desea, pueden introducirse diversos grupos en el péptido durante la síntesis o durante la expresión, que permitan la unión a otras moléculas o a una superficie. Por lo tanto, las cisteínas pueden utilizarse para fabricar tioéteres, histidinas para la unión a un complejo de iones metálicos, grupos carboxilo para la formación de amidas o ésteres, grupos amino para la formación de amidas y similares.

Las beta defensinas de mamífero, o los equivalentes funcionales de las mismas, también pueden aislarse y purificarse en conformidad con los métodos convencionales de síntesis recombinante. La síntesis recombinante puede realizarse utilizando vectores de expresión apropiados y un sistema de expresión eucariótico. Puede prepararse una solución del hospedador de expresión y el medio y las defensinas presentes purificarse utilizando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. Los métodos para expresión recombinante de la beta defensina humana 2 en *E. coli* se divulgan en el documento WO 2010/007166 (Novozymes).

**Dosificaciones**

En las composiciones farmacéuticas se emplea preferentemente una beta defensina de mamífero, tal como una beta defensina humana, en una cantidad que sea eficaz para tratar una enfermedad intestinal inflamatoria, preferentemente con una toxicidad aceptable para el paciente. Para tal tratamiento, la dosificación apropiada variará, por supuesto, dependiendo, por ejemplo, de la naturaleza química y de los datos de farmacocinética del compuesto de la presente divulgación utilizada, el hospedador individual, el modo de administración y la naturaleza y gravedad de las afecciones para tratar. Sin embargo, en general, para resultados satisfactorios en mamíferos grandes, por ejemplo seres humanos, una dosificación diaria indicada es preferentemente de aproximadamente 0,0001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal; tal como 0,005 mg/kg de peso corporal a 5 mg/kg de peso corporal, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, administrado en dosis divididas hasta una, dos, tres o cuatro veces al día. Los compuestos de las realizaciones preferentes de la presente divulgación pueden administrarse a mamíferos grandes, por ejemplo seres humanos mediante modos similares de administración a dosificaciones similares a las utilizadas de forma convencional.

En una realización de la presente divulgación, la dosificación diaria es preferentemente de 0,0001-10 mg/kg de peso corporal, más preferentemente 0,001-10 mg/kg de peso corporal, más preferentemente 0,005-5 mg/kg de peso corporal.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, las composiciones farmacéuticas de las realizaciones preferentes de la presente divulgación pueden incluir una beta defensina de mamífero, tal como una beta defensina humana, en una cantidad de aproximadamente 0,5 mg o menos a aproximadamente 1.500 mg o más por forma farmacéutica unitaria dependiendo de la vía de administración, preferentemente de aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9 mg a aproximadamente 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900 o 1.000 mg, y más preferentemente de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 mg a aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mg. En determinadas realizaciones de la presente divulgación, sin embargo, pueden ser preferentes dosificaciones menores o mayores que las mencionadas anteriormente. Un experto en la materia puede determinar fácilmente las concentraciones y dosificaciones apropiadas.

En una realización de la presente divulgación, la beta defensina de mamífero se administra al menos una vez al día, tal como al menos dos veces al día, por ejemplo al menos 3 veces al día, tal como al menos 4 veces al día.

La presente divulgación se describirá adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben considerarse limitantes del ámbito de la divulgación.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

Modelo de colitis inducida por Dextrano Sulfato de sodio (DSS) de 10 días en el ratón.

El objetivo del siguiente estudio era determinar la actividad antiinflamatoria de la beta defensina humana 2 en un modelo agudo (10 días) de enfermedad intestinal inflamatoria (colitis) inducida por la administración oral de dextrano sulfato de sodio (DSS) en el ratón.

El modelo de ratón de colitis por DSS es un modelo bien reconocido para el estudio la enfermedad intestinal inflamatoria, como se describe en Kawada *et al.* "Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease", World 15 J. Gastroenterol., Vol. 13 (42), pág. 5581-5593 (2007); y Wirtz y Neurath "Mouse models of inflammatory bowel disease", Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 59 (11), 1073-1083 (2007).

**Materiales**

**Artículos de ensayo**

Beta defensina humana 2 (hBD2); 21-hemisuccinato de metilprednisolona ("Prednisolona"), tampón PBS (GIBCO).

**Animales de experimentación**

En el estudio se utilizaron ratones C57BL/6 machos (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona, España), dado que esta es una especie y sexo que ha demostrado desarrollar una inflamación significativa del colon cuando se le administra una solución de DSS al 2 % en el agua de bebida durante un período de 10 días.

**Identificación**

Los animales se identificaron mediante códigos alfanuméricos en sus colas. De forma adicional, cada jaula se identificó mediante una tarjeta codificada mediante color que indicaba el número y sexo de los animales, el código o nombre del artículo de ensayo, el nivel de dosis, la vía de administración, el período de tratamiento, el número de grupo, el código del estudio y el nombre del director del estudio.

**Peso**

El peso corporal promedio de los animales en el día del inicio del estudio era de 22,4 ± 0,16 g.

**Aclimatación**

Un mínimo de 7 días antes del inicio del estudio, en las mismas condiciones que las del estudio principal.

**Alojamiento**

A la llegada, los animales se separaron y alojaron al azar en jaulas de policarbonato (E-Type, Charles River, 255x405x197 mm) con tapas de acero inoxidable. Los animales se alojaron en grupos de cinco animales por caja de acuerdo con su sexo, en animalarios con temperatura controlada (22 ± 2 ºC), iluminación (12/12 horas de luz/oscuridad), presión de aire, número de renovaciones de aire y humedad relativa (30-70 %). Todas las jaulas tenían serrín (Lignocel 3-4, Harlan Interfauna Ibérica, España) en el suelo como cama. Todos los ratones tenían acceso libre a una alimentación para roedores convencional seca en gránulos (Teklad Global 2014, Harlan Interfauna Ibérica, España). El agua se proporcionó a voluntad en botellas. El suministro de agua de grifo a los animalarios se analizó de forma periódica para comprobar su composición y para detectar posibles contaminantes (químicos y microbiológicos).

**Equipamiento y materiales**

**Equipamiento:**

Balanza para animales de Sartorius Mod. BP 2.100
Equipamiento de disección quirúrgico
Centrífuga Eppendorf 5415 C
Microscopio de Nikon Eclipse E600FN
Mezclador rotatorio de Hook & Tucker instruments
Homogeneizador IKA Ultra Turrax
Balanza analítica de Sartorius Mod. BP 221S

**Materiales y reactivos:**

Jeringas desechables estériles (1 ml)
Conjunto de infusión de aguja palomilla 25 G estéril
Anestésico (Ketamina/Xilazina)
Crema anestésica tópica (EMLA, Astra Zeneca)
Dextrano Sulfato de Sodio 30.000-50.000 Daltons (MP Biomedicals)
Solución salina tamponada con fosfato (PBS; Sigma)
Formalina neutra tamponada (VWR)

**Protocolo experimental**

Diseño del estudio: los animales se dividieron en 5 grupos experimentales. Cada grupo consistió en 10 machos: Grupo A: Tratado con vehículo de control (PBS) v.o., dos veces al día. Grupo B: Tratado con metilprednisolona (1 mg/kg v.o. dos veces al día). Grupo C: Tratado con hBD2 (0,05 mg/kg v.o. dos veces al día). Grupo D: Tratado con hBD2 (0,5 mg/kg v.o. al día). Grupo E: Tratado con hBD2 (5 mg/kg v.o., al día). En todos los grupos experimentales la asignación de los animales se realizó de una manera aleatoria. Se alojó un máximo de 5 ratones en cada jaula (de acuerdo con la Directiva 86/609/EEC). A su llegada al laboratorio y antes de la administración de los artículos de ensayo todos los animales se pesaron.

**Administración de la sustancia de ensayo**

El vehículo de control y hBD2 se administraron por vía oral con el uso de un catéter estéril en un volumen de dosificación de 10 ml/kg de peso corporal. En todos los grupos los animales recibieron 2 dosis diarias (a las 9.00 h y a las 17.00 h) del correspondiente artículo de ensayo (de ensayo, de referencia o vehículo) durante 10 días consecutivos (1-10 días experimentales).

**Procedimiento experimental**

**Inducción de Colitis**

La colitis se indujo en los ratones complementando su agua de bebida con DSS al 2 % durante 7 días. En el día 1, todos los ratones se pesaron y rotularon de acuerdo con sus grupos experimentales. La botella de bebida de cada jaula se llenó con la solución de DSS, asegurándose de que todas las tapas de la botella estuvieran colocadas de forma apropiada y de que ninguna estuviese obstruida. En el día 3, se vaciaron las botellas de cualquier solución restante y se rellenaron con solución de DSS recién preparada. Este procedimiento se repitió otra vez en el día 5. En el día 8, se desechó la solución restante y se reemplazó por agua esterilizada por autoclave. Los animales se sacrificaron 2 días más tarde, en el día 10.

**Evaluación clínica** (Índice de Actividad de la Enfermedad)

Se llevó a cabo una evaluación clínica diaria de los animales tratados con DSS, con el cálculo de un Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE) clínico validado que variaba de 0 a 4 de acuerdo con los siguientes parámetros: consistencia de las deposiciones, presencia o ausencia de hemorragia rectal y pérdida de peso:

| Descripción | Puntuación |
|---|---|
| Cambio en el peso corporal:<br><1 %<br>1-5 %<br>>5-10 %<br>>10-15 %<br>>15 % | <br>0<br>1<br>2<br>3<br>4 |
| Hemorragia rectal:<br>Negativo<br>Positivo | <br>0<br>4 |
| Consistencia de las deposiciones:<br>Normal<br>Heces sueltas<br>Diarrea | <br>0<br>2<br>4 |

La pérdida de peso corporal se calculó como la diferencia porcentual entre el peso corporal original (Día 1) y el peso corporal real en cada día del experimento (2-10). El aspecto de diarrea se define como material adherente de moco/fecal en el pelaje anal. La hemorragia rectal se define como diarrea que contiene sangre/moco visible o hemorragia rectal marcada. La puntuación máxima del IAE en cada día es de 12.

**Eutanasia y recolección de muestras del colon**

El día 10, dos horas después de la última administración del vehículo de control, de hBD2 o prednisolona, se mató a los animales mediante una sobredosis de anestésico. Sus cólones se extrajeron y se midieron su longitud y peso tras la exclusión del ciego. Se tomaron dos cortes (proximal y distal) de cada animal y se conservaron en formalina neutra tamponada para el posterior análisis histológico (tinción por hematoxilina y eosina 20) de acuerdo con el siguiente sistema de puntuación:

Puntuación de Descripción: Sin cambios observados (0). Mínimos infiltrados de células inflamatorias en la mucosa dispersos, con o sin una mínima hiperplasia epitelial (1). Infiltrados de células inflamatorias leves dispersos a difusos, en ocasiones que se extienden a la submucosa y asociados con erosiones, con hiperplasia epitelial mínima a leve y empobrecimiento de mucina en las células caliciformes mínimo a leve (2). Infiltrado de células inflamatorias leve a moderado que a ocasiones era transparietal, a menudo asociados con úlceras, con hiperplasia epitelial y empobrecimiento de mucina moderados (3). Infiltrados de células inflamatorias marcados que a menudo eran transparietales y estaban asociados con úlceras con hiperplasia epitelial y empobrecimiento de mucina marcados (4). Inflamación transparietal marcada con úlceras graves y pérdida de glándulas intestinales (5).

**Evaluación histológica**

Se tomaron dos cortes (proximal y distal) del colon de cada animal, se procesaron para el análisis histológico (tinción de hematoxilina y eosina) y las puntuó un observador con ocultamiento del estudio de acuerdo con el sistema de puntuación histológica descrito anteriormente.

**Análisis estadístico**

La significación estadística de los resultados se evaluó utilizando el programa estadístico GraphPad Instat 3. Los resultados se expresan como la media ± el error típico de la media, en donde (n) es el número de animales. La diferencia entre los grupos para el peso corporal, el peso del colon y la longitud del colon se evaluó mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) para datos independientes más la posprueba de Dunnett para permitir múltiples comparaciones. La diferencia entre grupos para el índice de actividad de la enfermedad y la puntuación histológica se evaluó mediante la prueba de Kruskal-Wallis para datos independientes más la posprueba de Dunn para comparaciones múltiples. Se tomó un valor de $P<0,05$ como significativo. En las Figuras y en las tablas, las diferencias significativas frente al grupo de control (vehículo) correspondiente se denotan como: *$P<0,05$, **$P<0,01$, ***$P<0,001$.

**Resultados**

En el presente estudio, el tratamiento con el artículo de ensayo NZ39000 (hBD2) dio como resultado una inhibición significativa del índice de actividad de la enfermedad (IAE) cuando se administró de forma diaria a tres concentraciones de dosis (0,05, 0,5, 5 mg/kg) a través de la vía oral (Figura 1 y tablas a continuación). Se observó una inhibición significativa tras el tratamiento tanto con el artículo de referencia (prednisolona) como con hBD2, con las siguientes diferencias significativas:

Los días o tratamientos no mencionados no fueron significativamente diferentes.

| **hBD2 0,05 mg/kg** | | | |
|---|---|---|---|
| **Día** | **IAE NZ39000** | **IAE de Vehículo** | **Significación estadística frente al vehículo** |
| 6 | 1,2±0,59 | 4,4±0,72 | P<0,01 |
| 7 | 1,9±0,66 | 5,7±0,92 | P<0,05 |
| 8 | 4,5±0,86 | 9,2±0,25 | P<0,001 |
| 9 | 5,6±0,54 | 10,2±0,57 | P<0,001 |
| 10 | 8±0,73 | 11,6±0,4 | P<0,05 |

| **hBD2 0,5 mg/kg** | | | |
|---|---|---|---|
| **Día** | **NZ39000 DAI** | **IAE de Vehículo** | **Significación estadística frente al vehículo** |
| 6 | 1,7±0,67 | 4,4±0,72 | P<0,05 |
| 9 | 7,1±0,61 | 10,2±0,57 | P<0,05 |
| 10 | 7,3±0,7 | 11,6±0,4 | P<0,01 |

| hBD2 5 mg/kg | | | |
|---|---|---|---|
| **Día** | **NZ39000 DAI** | **IAE de Vehículo** | **Significación estadística frente al vehículo** |
| 3 | 0,5±0,27 | 2,6±0,7 | P<0,05 |
| 4 | 0,6±0,27 | 2,6±0,75 | P<0,05 |
| 5 | l,8±0,76 | 4,4±0,72 | P<0,05 |
| 6 | 1,4±0,6 | 4,4±0,72 | P<0,05 |
| 7 | 2,1±0,96 | 5,7±0,92 | P<0,05 |
| 8 | 5,4±0,87 | 9,2±0,25 | P<0,01 |
| 9 | 5,2±0,76 | 10,2±0,57 | P<0,001 |
| 10 | 5,6±0,48 | 11,6±0,4 | P<0,001 |

| Prednisolona 1 mg/kg | | | |
|---|---|---|---|
| **Día** | **NZ39000 DAI** | **IAE de Vehículo** | **Significación estadística frente al vehículo** |
| 6 | 7±0,33 | 11,6±0,4 | P<0,01 |

También se observó una reducción significativa tanto para el colon proximal como para el distal (Figuras 2 y 3).

**5. Conclusiones**

Los resultados demuestran que la hBD2 administrada por vía oral en las dosis analizadas reduce significativamente el aumento en el Índice de Actividad de la Enfermedad inducido por la administración de DSS en el día 6, 7, 8, 9 y 10, para 0,05 mg/kg, en el día 6, 9 y 10 para 0,5 mg/kg y en el día 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 a 5 mg/kg. De forma similar, los resultados obtenidos con el índice de la actividad de la enfermedad, el análisis histológico de los cólones proximal y distal de cada animal en el día 10 reveló una reducción muy significativa de la puntuación de daño histológico mediante hBD2 administrado por vía oral. El efecto fue más pronunciado en los cólones proximales que en los distales. En el presente estudio, el tratamiento con el artículo de ensayo hBD2 dio como resultado una inhibición significativa del índice de actividad de la enfermedad (IAE) cuando se administró de forma diaria, a 3 concentraciones de dosis por vía oral. Se sabe que el artículo de referencia (prednisolona) tiene un efecto supresor del apetito significativo en ratones (y se administró dos veces cada día), que puede a su vez dar como resultado un efecto significativo sobre el peso corporal de los animales no relacionado con la gravedad de la enfermedad. Para tomar este efecto en consideración, se llevó a cabo una puntuación de IAE adicional sin el efecto del cambio en el peso corporal, solo se utilizaron como parámetros medibles la consistencia de las deposiciones y la hemorragia rectal. En este caso, el artículo de ensayo hBD2 también demostró una actividad antiinflamatoria muy significativa, como lo hizo el artículo de referencia prednisolona. La administración de dextrano sulfato de sodio dio como resultado una inflamación significativa y la lesión del tejido colónico de los animales, como se evidenció tras el examen histológico. Esta lesión fue más pronunciada en el corte distal del colon en comparación con el corte proximal. El tratamiento con el artículo de ensayo hBD2 dos veces al día, a 3 concentraciones de dosis, dio como resultado una reducción significativa de este daño histológico en el colon proximal. De forma similar, el tratamiento con el artículo de ensayo hBD2 dos veces al día, en las concentraciones de dosis intermedia y alta, también dio como resultado una reducción significativa del daño histológico en el colon distal. El tratamiento con prednisolona a una dosis de 1 mg/kg v.o. dos veces al día (Grupo B) también redujo de forma significativa la lesión histológica inducida por DSS en el colon proximal y distal. Los resultados también muestran un aumento significativo del peso corporal en los animales tratados con la dosis alta del artículo de ensayo en el día 10 (P<0,05), en comparación con el grupo de control. Este resultado sugeriría una mejora del estado de salud general de los animales en los grupos de artículos de ensayo mencionados, lo que conduce a una menor pérdida de peso corporal (p. ej., por comer más, por una diarrea menor, etc.). Los animales tratados con prednisolona (grupo B) muestran una disminución significativa del peso corporal a partir del día 2 hasta la finalización del estudio. Como se mencionó anteriormente, esta disminución del peso corporal no puede tomarse como un indicio del estado de salud general de los animales

en este caso particular, dado que se sabe que la prednisolona tiene un efecto inhibidor significativo sobre el apetito en ratones, lo que explicaría la disminución del peso corporal. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran una actividad antiinflamatoria de la hBD2 administrada por vía oral en el modelo de colitis DSS inducida en el ratón tras un período de tratamiento de 10 días.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> Tratamiento oral de la enfermedad inflamatoria intestinal

<130> P2639PC00
<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 36
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(36)

<400> 1

```
Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
1               5                   10                  15

Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala
            20                  25                  30

Lys Cys Cys Lys
        35
```

<210> 2
<211> 41
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(41)

<400> 2

```
Gly Ile Gly Asp Pro Val Thr Cys Leu Lys Ser Gly Ala Ile Cys His
1               5                   10                  15

Pro Val Phe Cys Pro Arg Arg Tyr Lys Gln Ile Gly Thr Cys Gly Leu
            20                  25                  30

Pro Gly Thr Lys Cys Cys Lys Lys Pro
        35                  40
```

<210> 3
<211> 45
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(45)

<400> 3

```
Gly Ile Ile Asn Thr Leu Gln Lys Tyr Tyr Cys Arg Val Arg Gly Gly
1               5                   10                  15

Arg Cys Ala Val Leu Ser Cys Leu Pro Lys Glu Glu Gln Thr Gly Lys
            20                  25                  30

Cys Ser Thr Arg Gly Arg Lys Cys Cys Arg Arg Lys Lys
        35                  40                  45
```

<210> 4
<211> 50
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(50)

<400> 4

```
Glu Phe Glu Leu Asp Arg Ile Cys Gly Tyr Gly Thr Ala Arg Cys Arg
1               5                   10                  15

Lys Lys Cys Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile Gly Arg Cys Pro Asn Thr
            20                  25                  30

Tyr Ala Cys Cys Leu Arg Lys Trp Asp Glu Ser Leu Leu Asn Arg Thr
        35                  40                  45

Lys Pro
    50
```

<210> 5
<211> 37
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante de hBD-4 que consiste en los aminoácidos 3-39 de SEQ ID NO: 4

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(37)

<400> 5

```
Glu Leu Asp Arg Ile Cys Gly Tyr Gly Thr Ala Arg Cys Arg Lys Lys
1               5                   10                  15
```

Cys Arg Ser Gln Glu Tyr Arg Ile Gly Arg Cys Pro Asn Thr Tyr Ala
20 25 30

Cys Cys Leu Arg Lys
35

<210> 6
<211> 40
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(40)

<400> 6

Lys Ile Asn Asn Pro Val Ser Cys Leu Arg Lys Gly Gly Arg Cys Trp
1 5 10 15

Asn Arg Cys Ile Gly Asn Thr Arg Gln Ile Gly Ser Cys Gly Val Pro
20 25 30

Phe Leu Lys Cys Cys Lys Arg Lys
35 40

**REIVINDICACIONES**

1. Una beta defensina de mamífero para su uso en el mantenimiento de un sujeto que padece de una enfermedad inflamatoria intestinal en remisión, comprendiendo dicho método administrar por vía oral una cantidad terapéuticamente eficaz de una beta defensina de mamífero a dicho sujeto en remisión.

2. La beta defensina de mamífero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn.

3. La beta defensina de mamífero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa.

4. La beta defensina de mamífero para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la fase de remisión de la colitis ulcerosa se selecciona del grupo que consiste en pancolitis/remisión, colitis del lado izquierdo/remisión y enfermedad resistente a la terapia en remisión.

5. La beta defensina de mamífero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la beta defensina de mamífero tiene al menos el 80 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

6. La beta defensina de mamífero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la beta defensina de mamífero es una variante de la beta defensina humana 2, en la que se han cambiado no más de 10, preferentemente no más de 5, más preferentemente no más de 2 aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 2.

7. La beta defensina de mamífero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha beta defensina de mamífero se administra al menos una vez al día, tal como al menos dos veces al día, por ejemplo al menos 3 veces al día.

8. La beta defensina de mamífero para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la beta defensina de mamífero se administra a una dosificación diaria de 0,0001-10 mg/kg, preferentemente 0,001-10 mg/kg, más preferentemente 0,005-5 mg/kg.

Figura 1

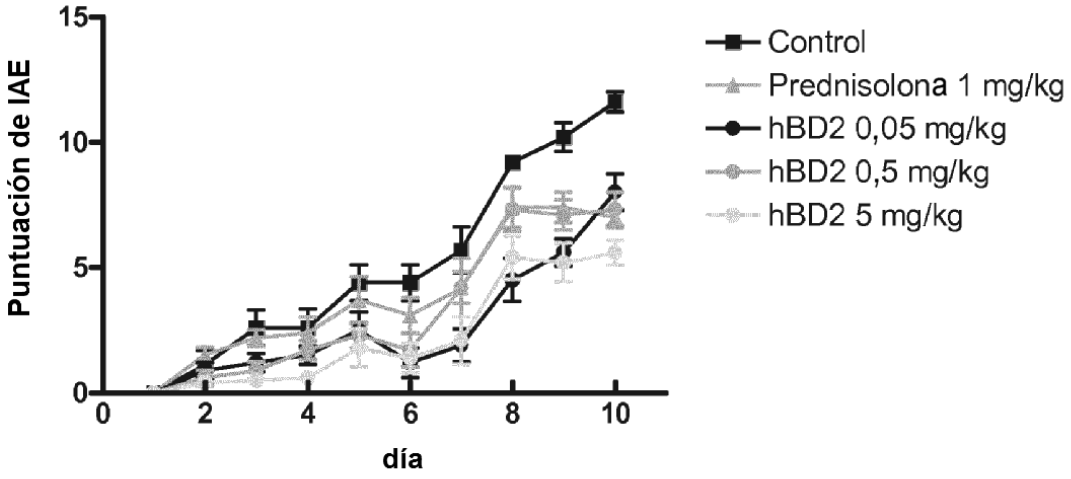



Figura 2

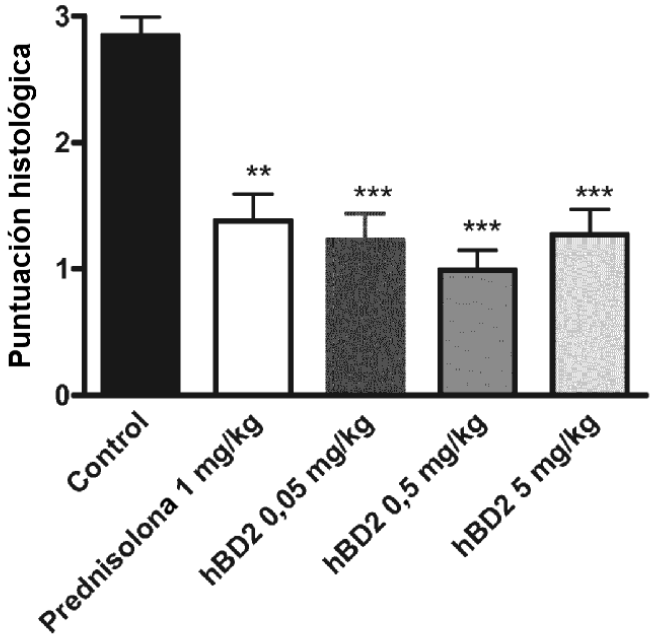
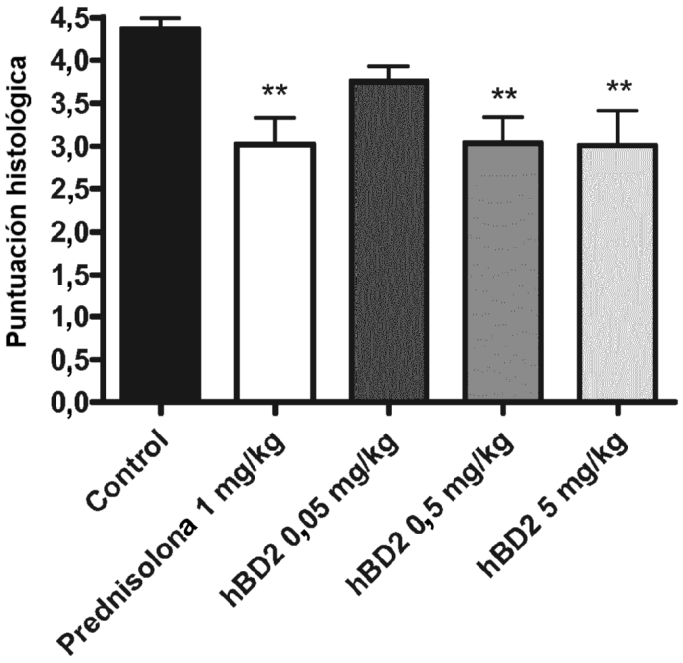


Figura 3


Puntuación histológica
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
**
**
**
Control
Prednisolona 1 mg/kg
hBD2 0,05 mg/kg
hBD2 0,5 mg/kg
hBD2 5 mg/kg

## Figura 4

**Alineamientos de múltiples secuencias por Clustal W (2.1) de la beta defensina 2**

```
UNIPROT_O15263_Human            ---GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQ
UNIPROT_Q9BDS9_Rhesus_macaque   ---GIGDPVTCLKNGAICHPVFCPRRYKQ
UNIPROT_Q9TT12_Chimpanzee       ---GISDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQ
UNIPROT_A4H1Z7_Orangutan        VFGDISNPVTCLRSGAICHPGFCPRRYKH
                                   .*.:*****:.****** *******:

UNIPROT_O15263_Human            IGTCGLPGTKCCKKP
UNIPROT_Q9BDS9_Rhesus_macaque   IGTCGLPGTKCCKKP
UNIPROT_Q9TT12_Chimpanzee       IGTCGLPGTKCCKKP
UNIPROT_A4H1Z7_Orangutan        IGTCGLSVIKCCKKP
                                ******.  ******
```

## Figura 5

**Alineamientos de múltiples secuencias por Clustal W (2.1) de las beta defensinas humanas**

```
HBD1    ------DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCYRGKAKCCK----------
HBD2    ---GIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP-----------
HBD4S   -----ELDRICGYGTARCR-KKCRSQEYRIGRCPN-TYACCLRK-----------
HBD4L   ---EFELDRICGYGTARCR-KKCRSQEYRIGRCPN-TYACCLRKWDESLLNRTKP
HBD3    GIINTLQKYYCRVRGGRCAVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK----------
                  *    . *    *       * *      **
```