

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 227**

51 Int. Cl.:

A01N 25/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12P 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2014 PCT/US2014/045444**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15003149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2014 E 14819813 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3016512**

54 Título: **CD33 soluble para tratar síndromes mielodisplásicos (MDS)**

30 Prioridad:

05.07.2013 US 201361843274 P
23.01.2014 US 201461930798 P
24.01.2014 US 201461931366 P
10.04.2014 US 201461978009 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.08.2020

73 Titular/es:

**H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND
RESEARCH INSTITUTE, INC. (100.0%)**
12902 Magnolia Drive
Tampa, FL 33612, US

72 Inventor/es:

LIST, ALAN F. y
WEI, SHENG

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 777 227 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

CD33 soluble para tratar síndromes mielodisplásicos (MDS)

5 ANTECEDENTES

Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son tumores malignos de células madre hematopoyéticas con una prevalencia creciente debido al envejecimiento de la población estadounidense. Los MDS comprenden un grupo de trastornos hematológicos malignos asociados con eritropoyesis alterada, diferenciación mieloide desregulada y mayor riesgo de transformación de leucemia mieloide aguda (LMA). La incidencia de los MDS aumenta en 15.000 a 20.000 casos nuevos cada año en los Estados Unidos y un gran número de pacientes requieren transfusiones de sangre crónicas. La eritropoyesis ineficaz sigue siendo el principal desafío terapéutico para pacientes con subtipos más indolentes, impulsado por una interacción compleja entre anomalías genéticas intrínsecas al clon del MDS y señales inflamatorias dependientes de la senescencia dentro del microentorno de la médula ósea (MO). Aunque tres agentes están aprobados para el tratamiento del MDS en los Estados Unidos (EE.UU.), la lenalidomida (LEN) representa el único tratamiento terapéutico dirigido. El tratamiento con LEN produce una independencia sostenida de la transfusión de glóbulos rojos acompañada de una resolución parcial o completa de las anomalías citogenéticas en la mayoría de los pacientes con una delección del cromosoma 5q (del5q), mientras que solo una minoría de pacientes con MDS no del5q logran una respuesta significativa, con poca frecuencia acompañado de una mejoría citogenética. Aunque las respuestas en pacientes con el MDS del5q son relativamente duraderas y se extienden en promedio a 2,5 años, la resistencia emerge con el tiempo con la reanudación de la dependencia transfusional.

Brinkman-Van der Linden y col. (Molecular and Cellular Biology, junio de 2003, 23 (12) 4199-4206) examinan la especificidad de unión y el patrón de expresión de CD33 de ratón y exploran sus funciones generando ratones deficientes en CD33 de ratón. Brinkman-Van der Linden y col. también describen una proteína de fusión recombinante que consiste en un dominio extracelular del CD33 humano y una región Fc de inmunoglobulina.

Cheng y col. (The Journal of Immunology 1 de julio de 2008, 181 (1) 22-26) describen que TLR2 es un receptor funcional para el amiloide sérico de fase aguda A. Cheng y col. también describen una proteína de fusión recombinante que consiste en un dominio extracelular del receptor tipo toll 4 (TLR4) y una región Fc de inmunoglobulina.

La Publicación de solicitud de patente de los EE.UU. No. 2010/0166775 describe un procedimiento para identificar un compuesto para su uso en terapia que modula la interacción de S100A9 con un ligando. La Publicación de solicitud de patente de los EE.UU. No. 2010/0166775 también describe una proteína de fusión recombinante que consiste en un dominio extracelular del receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE) y una región Fc de inmunoglobulina.

Björk y col. (PLOS Biology 2009, 7(4): e1000097) describen la identificación del S100A9 humano como objetivo para el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediante la unión a quinolona-3-carboxamidas. Björk y col. también describen que RAGE y TLR4 están bloqueados en su unión a S100A9 por el mismo fragmento Fab de anticuerpo.

RESUMEN

Las realizaciones de la invención se establecen en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

45

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión recombinante quimérica, que comprende:

(a) una combinación de al menos dos fracciones de unión a S100A9 seleccionados de entre el grupo que consiste en un dominio extracelular de CD33 humano, un dominio extracelular de receptor tipo toll 4 (TLR4) y un dominio extracelular de receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE); y
(b) una región Fc de inmunoglobulina.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un complejo multimérico que comprende dos o más proteínas de fusión de la invención conjugadas con una molécula o partícula central.

55

En otro aspecto, la presente invención proporciona la proteína de fusión de la invención o el complejo multimérico de la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad o afección provocada o exacerbada por la actividad de S100A9, que comprende administrar una composición que comprende dicha proteína de fusión o complejo multimérico a un sujeto que lo necesita.

60

En esta invención se muestra que las células supresoras derivadas mieloides (MDSC) CD33⁺ se acumulan específicamente en la MO de pacientes con MDS y deterioran la hematopoyesis a través de un mecanismo que

involucra a S100A9 como un ligando endógeno para la señalización iniciada por CD33. Por lo tanto, se describen composiciones y procedimientos para tratar el MDS que generalmente involucran administrar una cantidad eficaz de un antagonista de CD33/S100A9 para inhibir la activación de las MDSC. Por ejemplo, el procedimiento puede involucrar administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición que comprende un agente 5 que se une a y secuestra el S100A9.

En algunas realizaciones, el antagonista de CD33/S100A9 se une a y secuestra el S100A9 endógeno e inhibe su unión al receptor CD33 en las MDSC. El antagonista de CD33/S100A9 de la invención es una molécula que contiene dos o más dominios de unión a S100A9. El antagonista de CD33/S100A9 es una proteína de fusión quimérica que 10 comprende una combinación del ectodominio de CD33, receptor tipo toll 4 (TLR4) o un receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE). Este ectodominio de CD33, TLR4 y/o RAGE puede ser cualquier fragmento de CD33, TLR4 y/o RAGE capaz de unirse a S100A9. Por ejemplo, en algunos casos, el ectodominio CD33 contiene solo la región variable de CD33.

15 Por lo tanto, se describe una proteína de fusión recombinante que comprende una región Fc de inmunoglobulina; y uno, dos, tres o más de un dominio extracelular CD33 humano, un dominio extracelular TLR4, un dominio extracelular RAGE, o una combinación de los mismos que se une a la proteína S100A9 y está unida por un enlace peptídico o una secuencia de enlace peptídico al extremo carboxi de la región Fc de inmunoglobulina. La proteína de fusión puede contener además un péptido aceptor de biotina que puede biotinilarse con biotina ligasa (BirA) en presencia de biotina 20 y ATP.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una fórmula seleccionada de entre el grupo que consiste en:

25 eCD33 - eTLR4 - Fc,
eCD33 - eRAGE - Fc,
eTLR4 - eRAGE - Fc,
eRAGE - eTLR4 - Fc,
30 eCD33 - eTLR4 - eRAGE - Fc,
eCD33 - eRAGE - eTLR4 - Fc,
eTLR4 - eCD33 - eRAGE - Fc,
eRAGE - eCD33 - eTLR4 - Fc,
eTLR4 - eRAGE - eCD33 - Fc, y
eRAGE - eTLR4 - eCD33 - Fc,

35 donde "eCD33" es el dominio extracelular del CD33 humano,
donde "eTLR4" es el dominio extracelular de TLR4,
donde "eRAGE" es el dominio extracelular de RAGE,
donde "Fc" es la región Fc de inmunoglobulina, y
40 donde "-" es un ligador peptídico o un enlace peptídico.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende una fórmula seleccionada de entre el grupo que consiste en:

45 eCD33 - eTLR4 - Fc - Avi,
eCD33 - eRAGE - Fc - Avi,
eTLR4 - eRAGE - Fc - Avi,
eRAGE - eTLR4 - Fc - Avi,
50 eCD33 - eTLR4 - eRAGE - Fc - Avi,
eCD33 - eRAGE - eTLR4 - Fc - Avi,
eTLR4 - eCD33 - eRAGE - Fc - Avi,
eRAGE - eCD33 - eTLR4 - Fc - Avi,
eTLR4 - eRAGE - eCD33 - Fc - Avi, y
eRAGE - eTLR4 - eCD33 - Fc - Avi

55 donde "eCD33" es el dominio extracelular del CD33 humano,
donde "eTLR4" es el dominio extracelular de TLR4,
donde "eRAGE" es el dominio extracelular de RAGE,
donde "Fc" es la región Fc de inmunoglobulina,
60 donde "Avi" es un péptido aceptor de biotina opcional que puede biotinilarse con biotina ligasa (BirA) en presencia de biotina y ATP, y
donde "-" es un ligador peptídico o un enlace peptídico.

La proteína S100A9 puede estar presente como un monómero o un dímero. Por ejemplo, la proteína S100A9 puede estar asociada a la proteína S100A8 como heterodímero. En estos casos, el antagonista de CD33/S100A9 se une a y secuestra el complejo heterodímero S100A8/A9.

5 El antagonista de CD33/S100A9 contiene al menos 2, 3 o más dominios de unión a S100A9. El antagonista de CD33/S100A9 es una proteína de fusión quimérica que comprende una combinación de uno o más ectodominios CD33, uno o más ectodominios TLR4 y/o uno o más ectodominios RAGE. La proteína de fusión comprende además una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (Fc), por ejemplo, de IgG4, IgG2 o IgG1.

10 Múltiples copias de la proteína de fusión también se pueden combinar para formar un complejo multivalente. Por lo tanto, en algunas realizaciones, dos, tres, cuatro, cinco o más proteínas de fusión se pueden unir a una molécula o partícula central. Por ejemplo, la porción Fc puede biotinizarse. La proteína de fusión biotinilada puede entonces conjugarse con una estreptavidina multimérica (por ejemplo, tetramérica). En otras realizaciones, dos o más proteínas de fusión se conjugan con la superficie de un liposoma u otra micropartícula. El complejo multivalente puede ser homogéneo, es decir que contiene múltiples copias de un tipo de una proteína de fusión, o puede ser heterogéneo. Por ejemplo, el complejo multivalente puede contener combinaciones de proteínas de fusión de CD33, TLR4 y RAGE de la invención. El complejo multivalente contiene proteínas de fusión multivalentes, es decir, al menos dos proteínas de fusión que contienen dos o más dominios de unión a S100A9.

20 En otros ejemplos que también se describen en esta invención, el inhibidor de CD33/S100A9 se une a e inhibe el receptor CD33 endógeno en las MDSC. Por lo tanto, en algunos ejemplos, el antagonista de CD33/S100A9 es una molécula que contiene un dominio de unión a CD33. Por ejemplo, el inhibidor de CD33/S100A9 puede ser una proteína recombinante que se une a CD33 sin activar las MDSC y compite por la unión del S100A9 endógeno. Por ejemplo, el inhibidor de CD33/S100A9 puede ser una variante mutante o truncada de S100A9, es decir, S100A9 negativo dominante.

30 En algunos ejemplos descritos en esta invención, el inhibidor de CD33/S100A9 es un anticuerpo o un aptámero que se une específicamente a CD33 o S100A9, inhibiendo así la activación endógena de CD33/S100A9.

También se describen procedimientos para tratar una enfermedad o afección en un sujeto, provocada o exacerbada por la actividad de S100A9, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un antagonista de CD33/S100A9 descrito en esta invención.

35 También se describen procedimientos para identificar un agente para tratar el MDS. En algunos ejemplos, los procedimientos involucran la detección de agentes candidatos para la capacidad de evitar la unión de S100A9 a CD33. En otros ejemplos, los procedimientos involucran la detección de agentes candidatos para la capacidad de evitar la activación de CD33 por S100A9.

40 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A a 1N muestran una mayor acumulación y función de las MDSC en células de la MO de pacientes con MDS. La Figura 1A muestra el porcentaje de MDSC en las MNC-MO del MDS (n = 12), especímenes de cáncer sanos (n = 8) y no relacionados con el MDS (n = 8, 4 de seno, 4 linfomas, $P < 0,0001$). La Figura 1B muestra el FISH del cromosoma 7 de MDSC clasificadas o no MDSC de MNC de la MO del MDS (n = 5, CEP7 y 7q31). Las figuras 1C y 1D muestran la incorporación de ^3H -timidina (Fig. 1C) y IFN- γ ELISA (Fig. 1D) de células T autólogas estimuladas cocultivadas con MDSC del MDS clasificadas en proporciones de 1:0,25 y 1:0,5 (células T:MDSC). Las barras de error indican la desviación estándar de tres muestras de pacientes separadas y analizadas por triplicado. La Figura 1E muestra la incorporación de BrDu de células T estimuladas después de mezclarlas con MNC-MO autólogas sin clasificar, desprovistas de MDSC (-MDSC) o remezcladas (+MDSC). Las Figuras 1F a 1I muestran MDSC clasificadas de MDS o MO de donantes sanos probadas para la producción de IL-10 (Fig. 1F), TGF β (Fig. 1G), arginasa (Fig. 1H) y NO (Fig. 1I) mediante ELISA después de 24 horas de cultivo. La Figura 1J muestra la zona de contacto de MDSC:precursor eritroide de MDSC del MDS clasificadas y precursores eritroides autólogos en una proporción de 1:3 (MDSC:precursor eritroide) mediante microscopía a los 0 y 30 minutos. Las células se tiñeron para CD71, glicoforina A, CD33 y granzima B. La Figura 1K muestra MDSC del MDS clasificadas o donantes sanos marcados con CD33 y granzima B coincubados con precursores eritroides autólogos purificados (0 o 30 min) y monitoreados mediante microscopía. (L) Recuentos de gránulos movilizados conjugados de MDSC-HPC. La Figura 1M muestra la exposición a anexina V en precursores eritroides (CD71 $^+$ CD235a $^+$) incubados con o sin MDSC de MO del MDS autólogas y clasificadas. La Figura 1N muestra la capacidad de formación de colonias de las MNC de la MO con MDS sin clasificar, -MDSC o remezcladas (+MDSC) (proporción de 1:3, *, $P < 0,005$, **, $P < 0,001$).

Las figuras 2A a 2G muestran señales de CD33 para mejorar las funciones supresoras de las MDSC. La Figura 2A

muestra MNC de la MO de pacientes con MDS ($n = 12$), donantes sanos compatibles con la edad ($n = 8$) y cánceres sin MDS ($n = 8$) analizados para la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD33, $* = P < 0,0005$. La Figura 2B muestra la concentración de IL-10, TGF- β y VEGF del sobrenadante de células U937 reticuladas de CD33 (o isotipo). Las barras representan la media $\pm$ EEM de tres pocillos en tres experimentos separados. La Figura 2C muestra MNC aisladas de la MO de donantes sanos e infectadas con un vector adenoviral que contiene GFP (Ad-GFP) o CD33 (Ad-CD33) durante 72 horas antes del análisis citométrico de flujo de los marcadores mieloides maduros, CD11c, CD80 y CCR7, con células no infectadas como control. La Figura 2D muestra los resultados del ensayo de formación de colonias donde, después de separar las MDSC de la MO de los pacientes con MDS, las células negativas de MDSC restantes se cultivaron con MDSC que se han infectado de forma simulada o infectadas con el vector lentiviral (LV) que contiene ARNhc no dirigido o ARNhc de CD33 (CD33hc) durante 14 días. Las MDSC también se cultivaron durante 72 horas después de la infección con construcciones que contienen LV descritas anteriormente antes de cultivar con células MO negativas para MDSC. $*$, $P < 0,001$, $**$, $P < 0,0001$, versus células tratadas con ARNhc de control. Las Figuras 2E a 2G muestran IL-10 (Fig. 2E) y TGF- β (Fig. 2F) en los sobrenadantes analizados mediante ELISA. $*$, $P < 0,05$, versus células tratadas con ARNhc de control. La Figura 2G muestra la actividad de arginasa en las células tratadas con CD33hc. $*P < 0,05$, versus células tratadas con ARNhc de control.

Las Figuras 3A a 3O muestran la identificación de S100A9 como ligando nativo para CD33. La Figura 3A muestra la tinción con azul de Coomassie de lisados de la MO precipitados con IgG de control o fusión de CD33. La Figura 3B muestra células SJCRH30 transfectadas (S100A8 en la parte superior izquierda y S100A9 en la parte inferior izquierda) teñidas con fusión de CD33 (APC). La Figura 3C muestra el ELISA de captura de S100A9 de lisados de células no transfectadas (negativas) o transfectadas con el S100A9. El anticuerpo secundario era anti-S100A9 (control positivo) o fusión de CD33. La Figura 3D muestra la dilución en serie de los lisados de células AD293 y SJCRH30, no transfectados o transfectados con el vector o S100A9, sobre una membrana de PVDF y se transferidos con la fusión de CD33. La tinción con azul Coomassie sirve como control de carga. La Figura 3E muestra la inmunoprecipitación con S100A9 del lisado de células transfectadas conjuntamente con SJCRH30 CD33/S100A9 transferida contra el CD33. La Figura 3F muestra PBMC y MNC de la MO de muestras sanas y de MDS inmunoprecipitadas con fusión de CD33 y transferidas para S100A9. La Figura 3G muestra la tinción de inmunofluorescencia de S100A9-DDK humano recombinante incubado con células SJCRH30 transfectadas con CD33 (panel superior) o transfectadas con vector (panel inferior) en los puntos de tiempo indicados. DAPI = núcleos, APC-DDK = rhS100A9. Las Figuras 3H a 3L muestran el tratamiento de células SJCRH30-CD33 con la IL-10 inducida por rhS100A9 (Fig. 3H) y la expresión de TGF- β (Fig. 3I). Las Figuras 3J a 3K muestran que el tratamiento de células U937 (línea celular mielóide de alta expresión de CD33) con rhS100A9 también induce la IL-10 (Fig. 3J) y la expresión de TGF β (Fig. 3K). La Figura 3L muestra la concentración de proteína S100A9 en el plasma de pacientes con MDS ($n = 6$) medida a través de ELISA. Las Figuras 3M a 3N muestran MDSC del MDS tratado con 1 μ g de rhS100A9 teñido para CD33-FITC y anti-DDK-APC (Fig. 3M) e inmunoprecipitado con anticuerpo anti-CD33, seguido de transferencia con anti-SHP-1 (Fig. 3N). La Figura 3O muestra el plasma de la MO de donantes sanos ($n = 3$) o pacientes con MDS ($n = 3$) usado para analizar el reclutamiento de SHP-1. En todos los experimentos, las barras de error representan el EEM de tres experimentos separados.

Las figuras 4A a 4N muestran que la señalización de S100A9 a través de CD33 en la MO con MDS está asociada a la activación de MDSC y a la función supresora. Las Figuras 4A a 4H muestran células de la MO sanas infectadas con adenovirus que contienen vectores de expresión de GFP o CD33 evaluadas mediante Q-PCR para la expresión de IL-10 (Fig. 4A), TGF- β (Fig. 4C), ARG2 (Fig. 4E) o NOS2 (Fig. 4F), o mediante ELISA para IL-10 (Fig. 4B) y TGF- β (Fig. 4D). La Q-PCR (Fig. 4G) y la citometría de flujo de la expresión de GFP (Fig. 4H) determinaron la eficiencia de la transfección. Las Figuras 4I y 4J muestran RAGE, TLR4, CD33 de células de la MO sanas o su combinación bloqueada antes de cultivar células por sí mismas o con 1 μ g de S100A9 durante 48 horas para determinar la expresión del gen IL-10 y la proteína (Q-PCR y ELISA, (Fig. 4I)) o la expresión de proteínas y genes TGF- β (Fig. 4J). La Figura 4K muestra el silenciamiento de la expresión de S100A8 y S100A9 en células primarias de la MO con MDS usando ARNhc específico (demostrado mediante Western Blot). Las Figuras 4L a 4N muestran que el silenciamiento inhibe la expresión de IL-10 (Fig. 4L) y TGF- β (Fig. 4M). $*$, $P < 0,01$, $**$, $P < 0,001$, versus células tratadas con ARNhc de control. La Figura 4N muestra el bloqueo de la expresión de S100A8 y S100A9 por ARNhc específico que promueve la formación de colonias en células aisladas de la MO de pacientes con MDS, $*$, $P < 0,05$, versus células tratadas con ARNhc de control. En todos los experimentos, las barras de error representan el EEM de la determinación por triplicado con tres especímenes primarios separados.

Las Figuras 5A a 5P muestran que los ratones S100A9Tg presentan una mayor acumulación y activación de las MDSC y muestran características displásicas que recapitulan la patología humana del MDS. La figura 5A muestra la acumulación de Gr1 $^{+}$ CD11b $^{+}$ de MDSC en MNC aisladas de la MO de ratones S100A9Tg a las 6, 18 o 24 semanas, ratones S100A9KO o TS tanto a las 6 como a las 24 semanas. La Figura 5B muestra el porcentaje de MDSC de la MO, el bazo y PBMC de ratones S100A9Tg a las 6, 18 y 24 semanas de edad mediante citometría de flujo. Las Figuras 5C a 5D muestran células del bazo ensayadas contra los marcadores de maduración F4/80 $^{+}$ Gr1 $^{-}$ (Fig. 5C) y I-Ad $^{+}$ (Fig. 5D). La Figura 5E muestra células Cr-1 $^{+}$ CD11b $^{+}$ clasificadas por FACS (+MDSC) de la MO de ratones descritos en la

- Figura 5A mezcladas de nuevo con una población celular negativa para MDSC de 1×10^5 autólogas (que contiene HSPC, -MDSC) en una proporción de 1:1 durante 14 días antes de evaluar la formación de colonias. Como control, se usó una población MDSC negativa. La Figura 5F muestra MDSC de ratones TS, S100A9Tg y S100A9 KO clasificados por FACS e incubados en una placa de 96 pocillos durante 24 horas, después de lo cual se midió la producción de IL-10 y TGF- β mediante ELISA. Las Figuras 5G a 5N muestran la comparación del análisis hematopatológico de ratones TS (Figuras 5G-5J) y S100A9Tg (Figuras 5K-5N). Los especímenes primarios de la MO del MDS se analizaron para determinar la ubicación del S100A9 en células positivas para CD33 (Fig. 5O) y células positivas para CD34 (Fig. 5P). Figuras de flujo representativas de experimentos por triplicado.
- 10 Las Figuras 6A a 6I muestran que el trasplante mixto de células madre hematopoyéticas (HSC) enriquecidas con S100A9 y HSC TS continúa los efectos sobre la hematopoyesis. La Figura 6A muestra la proporción de MDSC en ratones irradiados letalmente (900 Gy), trasplantados con HSC enriquecidas, ya sean de TS o S100A9Tg, o una mezcla en 1:1 de los dos a las 8 semanas (después del injerto). Figura representativa de 5 experimentos de trasplante. La Figura 6B muestra la expresión de GFP de las MDSC en la Figura 6A. La Figura 6C muestra el porcentaje de HSC LSK, definido como Linaje^cKit⁺Sca-1⁺, en ratones irradiados letalmente después del trasplante con TS, S100A9Tg o una mezcla 1:1 de HSC enriquecidas. Las Figuras 6D a 6F muestran la proporción y concentración de glóbulos blancos (CGB) (Fig. 6D), la hemoglobina (HGB) (Fig. 6E) y la concentración de glóbulos rojos (CGR) (Fig. 6F) medidas semanalmente mediante un hemograma completo después del trasplante. Las barras de error son el EEM de $n = 5$. La Figura 6G muestra el porcentaje de células CD34 positivas en especímenes de la MO con MDS desprovistos de MDSC tratadas con o sin S100A9 durante 48 horas. La Figura 6H muestra el mismo experimento que en la Figura 6G, evaluando la expresión de superficie de Anexina V y PI después del tratamiento con S100A9. La Figura 6I muestra que las células CD34 humanas sanas (Lonza Wakersfield) se trataron como en la Figura 6H y se cultivaron durante 48 horas seguidas mediante un análisis citométrico de flujo de Anexina V/PI.
- 25 Las Figuras 7A a 7I muestran que la activación de las MDSC y la señalización pueden mejorar el microentorno supresivo de la MO. Las Figuras 7A a 7B muestran que ATRA disminuye las MDSC en la MO de ratones S100A9Tg (Fig. 7A) y promueve la expresión de marcadores de maduración mieloide (Fig. 7B). La Figura 7C muestra la formación de colonias UFB de células de la MO de ratones TS y S100A9Tg tratadas con ATRA. Todos los cultivos eran duplicados. *, $P < 0,05$, entre ratones S100A9Tg tratados con ATRA y con el vehículo. La Figura 7D muestra el número de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas del análisis de hemograma completo de ratones tratados y no tratados con ATRA. *, $P < 0,05$, entre ratones S100A9Tg tratados con ATRA y con el vehículo. La Figura 7E muestra los niveles de expresión relativos de DAP12 de las MDSC aisladas de especímenes sanos o de MDS mediante qPCR ($n = 5$). La Figura 7F muestra células AD293 transfectadas con vector, DAP12-TS, DAP12 negativo dominante (DN) o DAP12 activo (P23) durante 48 horas y analizado mediante Western Blot para la expresión de Syk y ERK fosforilados o totales. Esto es representativo de tres experimentos independientes. Las MDSC se aislaron de la MO de pacientes con MDS y se infectaron con un vector adenoviral que contenía DAP12 de TS o activo (P23) durante 48 o 72 horas. Las Figuras 7G y 7H muestran la expresión superficial de CD14 o CD15 (Fig. 7G) o los marcadores de maduración CD80, CCR7 y CD11c (Fig. 7H) analizados por citometría de flujo. La Figura 7I muestra MDSC purificadas de MNC-MO de pacientes con MDS mediante clasificación de FACS y células infectadas con DAP12 LV-TS o LV-P23. Los ensayos de formación de colonias se efectuaron en metilcelulosa durante 14 días. Los resultados se muestran como media $\pm$ EEM de 7 pacientes. *, $P < 0,01$, **, $P < 0,001$, versus células infectadas con LV-TS.
- La Figura 8 muestra el porcentaje de injerto en ratones trasplantados. Se transplantaron ratones FVB/NJ hembra de tipo salvaje con HSC enriquecidas, ya sean de TS, S100A9Tg o una proporción de 1:1 de células masculinas TS:Tg. El porcentaje de injerto se evaluó midiendo la expresión del gen SRY mediante qPCR normalizada contra células de la MO de ratones machos no trasplantados. La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) sirve como control interno.
- La Figura 9 es un modelo de señalización mediada por CD33/Siglec 3 a través de motivos ITIM o ITAM. El CD33 presenta dos motivos ITIM citosólicos. Las quinasas Src fosforilan los residuos de tirosina presentes en el ITIMS después de la reticulación de CD33 o tras la interacción con su(s) ligando(s). Las ITIM fosforiladas reclutan y activan fosfatasas (SHP1, SHP2 o SHIP-1), lo que da como resultado una baja regulación de MAPK y, en última instancia, la inhibición celular y la producción de citocinas inhibitorias. La activación de CD33 también induce la expresión de S100A8 y S100A9, que se secretan y actúan como heterodímeros para CD33 o TLR4 y, como tales, median la inflamación y la activación de MDSC. Los siglecs que carecen de ITIM poseen aminoácidos cargados en su dominio transmembrana, lo que permite la asociación con DAP12, un adaptador de activación que lleva ITAM. Como es el caso con los ITIM, las quinasas Src también fosforilan residuos de tirosina en el ITAM de DAP12. La quinasa Syk y ZAP70 se reclutan y perpetúan la activación, diferenciación y/o maduración celular aguas abajo.
- 60 La Figura 10 muestra el efecto t del DAP12 activo sobre la maduración inmadura de DC. Las DC primarias se prepararon a partir de donantes sanos y se infectaron con vectores adenovirales que contenían GFP sola, WT-DAP12, dnDAP12 y DAP12 activo (Ad-P23) como se indica. Las células se cultivaron durante 72 horas antes del análisis de

citometría de flujo usando un marcador de superficie DC maduro como se indicó. Las DC infectadas de simulación y el isotipo IgG se incluyeron en el grupo de control. Cada construcción experimental se comparó con el control de vector vacío (histogramas rellenos), y las células infectadas se cerraron con GFP antes del análisis.

- 5 La figura 11 ilustra realizaciones ejemplares de un antagonista de CD33/S100A9. Las Figuras 11A a 11G muestran que una proteína de fusión contiene la porción Fc de IgG y un péptido aceptor de biotina (por ejemplo, secuencia AviTag™) para la biotilación por BirA o el reconocimiento de anticuerpos. La proteína de fusión en las Figuras 11A, 11C y 11G contiene el ectodominio de CD33. La proteína de fusión de 11B y 11D contiene solo la región variable del ectodominio de CD33 ("vCD33"). La región vCD33 en las Figuras 11C y 11D contiene polimorfismos de un solo
10 nucleótido ("SNP") en comparación con el vCD33 en las Figuras 11A y 11B. La proteína de fusión representada en las Figuras 11E, 11F y 11G contiene el ectodominio del receptor tipo toll 4 (TLR4). Las proteínas de fusión en las Figuras 11F y 11G también contienen el ectodominio de CD33 (Fig. 11G) o solo la región vCD33 (Fig. 11F). La Figura 11H muestra un complejo multimérico formado por la biotilación de la secuencia AviTag™ y la conjugación de estas proteínas de fusión a una estreptavidina tetramérica ("SA"). La Figura 11I muestra un complejo multimérico formado
15 por la incorporación de anticuerpos que se unen específicamente a AviTag™ en un liposoma.

- Las Figuras 12A y 12B muestran el nivel de cambio de la generación de caspasa-1 activa y la IL-1 β normalizada al control tratado con plasma en cuatro poblaciones celulares. La generación de la caspasa-1 activa y la IL-1 β se evaluó en cuatro poblaciones mediante citometría de flujo después del tratamiento con IgG de CD33: células madre
20 (CD34+CD38-), progenitoras (CD34+CD38+), eritroides (CD71+) y células mieloides (CD33+). Nivel de cambio de la generación de IFM de caspasa-1 activa (Fig. 12A) y la IL-1 β (Fig. 12B).

- Las Figuras 13A y 13B muestran el nivel de cambio de la generación de caspasa-1 activa y la IL-1 β normalizada al control tratado con plasma en cuatro poblaciones celulares. La generación de la caspasa-1 activa y la IL-1 β se evaluó en cuatro poblaciones mediante citometría de flujo después del tratamiento con un inhibidor de vía relacionada: células madre
25 (CD34+CD38-), progenitoras (CD34+CD38+), eritroides (CD71+) y células mieloides (CD33+). Nivel de cambio de la generación de IFM de caspasa-1 activa (Fig. 13A) y la IL-1 β (Fig. 13B).

- Las figuras 14A a 14C muestran que la neutralización del plasma S100A9 mediante la trampa de quimera CD33 mejora
30 la capacidad de formación de colonias en especímenes de pacientes con MDS. Las Figuras 14A a 14C muestran unidades formadoras de brotes de eritroides (UFB-E) (Fig. 14B), unidades formadoras de colonias multipotenciales (UFC-GEMM) (Fig. 14A) y unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos (UFC-GM) (Fig. 14C) en especímenes de pacientes con MDS tratadas con IgG, plasma o 0,1, 0,5 o 1,0 μ g de trampa quimérica IgG de CD33.

- Las Figuras 15A a 15C muestran cambios en la capacidad de formación de colonias en cuatro especímenes LR-MDS
35 tratados con quimera CD33. Las MNC de la MO de cada paciente se incubaron con plasma autólogo de la MO y concentraciones crecientes de IgG de CD33, y se colocaron en placas en cuatro réplicas por condición de tratamiento en metilcelulosa. Las colonias se contaron catorce días después de la distribución en placas y se promediaron para cada paciente. El aumento en CFC se representa como el cambio múltiplo normalizado a control incubado con plasma
40 para colonias GEMM (Fig. 15A), eritroides (Fig. 15B) y GM (Fig. 15C), respectivamente.

- Las Figuras 16A a 16E muestran que la trampa de quimera CD33 suprime la expresión génica relacionada con la piroptosis en las MNC de la MO con MDS. Las MNC de la MO se aislaron de cinco pacientes con MDS de bajo riesgo y se incubaron con plasma autólogo de la MO y concentraciones crecientes de la quimera CD33. Para la comparación,
45 se usaron las MNC aisladas de la MO de cinco donantes normales. Se aisló el ARN y se realizó una qPCR en genes relacionados con la piroptosis Caspasa-1 (Fig. 16A), IL-1 β (Fig. 16B), NLRP1 (Fig. 16C), NLRP3 (Fig. 16D) e IL-18 (Fig. 16E). La expresión génica se representa como el cambio múltiplo normalizado a los donantes normales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 50 Las células supresoras derivadas de mieloides inmaduros (MDSC), que se sabe que se acumulan en ratones portadores de tumores y pacientes con cáncer, son células efectoras inflamatorias e inmunosupresoras de células T específicas del sitio que contribuyen a la progresión del cáncer (Gabrivovich, D.I., y col. 2009 Nat Rev Immunol 9:162-174; Kusmartsev, S., y col. 2006. Cancer Immunol Immunother 55:237-245). Su actividad supresora está en parte
55 impulsada por moléculas de señalización asociadas a la inflamación, como el heterodímero de patrón molecular asociado al peligro (DAMP) S100A8/S100A9 (también conocido como proteína relacionada con mieloides (MRP)-8 y MRP-14, respectivamente), a través de la ligadura de TLR4 (Ehrchen, J.M. y col. 2009. J Leukoc Biol 86:557-566; Vogl, T., y col. 2007. Nat Med 13:1042-1049). Las MDSC murinas CD11b⁺Gr1⁺ forman la base de la gran mayoría de los estudios mecanicistas, sin embargo, se ha informado mucho menos sobre sus homólogos humanos. Las MDSC
60 humanas carecen de la mayoría de los marcadores de células inmunes maduras (LIN⁻, HLA-DR⁻) pero posee CD33, el miembro prototípico de la superfamilia de lectinas (Siglec) similar a la inmunoglobulina de unión al ácido siálico (Ig) (Gabrivovich, D.I., y col. 2009 Nat Rev Immunol 9:162-174; Talmadge, J.E. 2007. Clin Cancer Res 13:5243-5248;

Talmadge, J.E., y col. 2007. Cancer Metastasis Rev 26:373-400; Crocker, P.R., y col. 2007. Nat Rev Immunol 7:255-266). Es importante destacar que, aunque se desconoce su acción precisa, el CD33 posee un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) que está asociado a la supresión inmune (Crocker, P.R., y col. 2007 Nat Rev Immunol 7:255-266).

5

Aquí se muestra que las MDSC LIN⁻HLA-DR⁻CD33⁺ se acumulan específicamente en la MO de pacientes con MDS (en esta invención, denominadas MDSC del MDS) y perjudican la hematopoyesis a través de un mecanismo que involucra S100A9 como un ligando endógeno para la señalización iniciada por CD33. Es importante destacar que, al usar ratones transgénicos S100A9 (S100A9Tg), se muestra que la activación sostenida de esta vía inflamatoria conduce al desarrollo de MDS, y que este fenotipo hematológico es rescatado por estrategias que suprimen la señalización de ITIM CD33. El hallazgo descrito de que S100A9 liga CD33 para inducir la expansión de las MDSC indica que dirigirse a esta vía puede proporcionar un enfoque terapéutico para el tratamiento del MDS. Finalmente, el descubrimiento de esta vía de señalización verifica el papel de S100A9 como un importante iniciador de la inmunosupresión. Por lo tanto, los ratones S100A9Tg pueden servir como un modelo útil para el estudio de la patogénesis del MDS, el tratamiento y el papel general de las MDSC en el cáncer.

10

15

Por lo tanto, se describen composiciones y procedimientos para tratar el MDS que involucren el uso de un inhibidor de CD33/S100A9 para inhibir la activación de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC).

20 Inhibidor de CD33/S100A9

En algunas realizaciones, el inhibidor de CD33/S100A9 se une a y secuestra el S100A9 endógeno e inhibe su unión al receptor CD33 en las MDSC. El antagonista de CD33/S100A9 de la invención es una molécula que contiene al menos dos dominios de unión a S100A9. En otros ejemplos que se describen en esta invención, el inhibidor de CD33/S100A9 se une a e inhibe el receptor CD33 endógeno en las MDSC. Por lo tanto, en algunos ejemplos, el antagonista de CD33/S100A9 es una molécula que contiene un dominio de unión a CD33.

25

Receptores solubles

Por ejemplo, el inhibidor de CD33/S100A9 puede comprender un receptor de CD33 soluble. Un "receptor soluble" es un polipéptido receptor que no está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son los polipéptidos receptores de unión a ligando que carecen de dominios transmembrana y citoplasmáticos. Los receptores solubles pueden comprender residuos de aminoácidos adicionales, tales como etiquetas de afinidad que proporcionan la purificación del polipéptido o proporcionan sitios para la unión del polipéptido a un sustrato o secuencias de regiones constantes de inmunoglobulina. Muchos receptores de la superficie celular presentan contrapartidas solubles de origen natural que se producen por proteólisis. Se dice que los polipéptidos receptores solubles están sustancialmente libres de segmentos de polipéptidos transmembrana e intracelulares cuando carecen de porciones suficientes de estos segmentos para proporcionar anclaje a la membrana o transducción de señales, respectivamente.

35

40

El antagonista de CD33/S100A9 de la invención es una proteína de fusión quimérica que comprende una combinación del ectodominio de CD33 receptor tipo toll 4 (TLR4) o un receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE). Este ectodominio de CD33, TLR4 y/o RAGE puede ser cualquier fragmento de CD33, TLR4 y/o RAGE capaz de unirse a S100A9.

45

Las proteínas de fusión, también conocidas como proteínas quiméricas, son proteínas creadas mediante la unión de dos o más genes que originalmente codificaron proteínas separadas. La traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades de función derivadas de cada una de las proteínas originales. Las proteínas de fusión recombinantes pueden crearse artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en investigaciones biológicas o terapéuticas. Las proteínas mutantes quiméricas se producen naturalmente cuando una mutación a gran escala, típicamente una translocación cromosómica, crea una nueva secuencia codificante que contiene partes de las secuencias codificantes de dos genes diferentes.

50

La funcionalidad de las proteínas de fusión es posible por el hecho de que muchos dominios funcionales de proteínas son modulares. En otras palabras, la porción lineal de un polipéptido que corresponde a un dominio dado, tal como un dominio de tirosina quinasa, puede eliminarse del resto de la proteína sin destruir su capacidad enzimática intrínseca. Por consiguiente, cualquiera de los dominios funcionales descritos en esta invención puede usarse para diseñar una proteína de fusión.

55

Una proteína de fusión recombinante es una proteína creada mediante ingeniería genética de un gen de fusión. Esto generalmente involucra eliminar el codón de parada de una secuencia de ADNc que codifica la primera proteína y, a continuación, adicionar la secuencia de ADNc de la segunda proteína en el marco a través de PCR de ligadura o extensión de superposición. Esa secuencia de ADN será expresada por una célula como una proteína única. La

60

proteína puede ser diseñada para incluir la secuencia completa de ambas proteínas originales, o solo una porción de cualquiera de ellas.

Si las dos entidades son proteínas, a menudo también se adicionan péptidos ligadores (o "espaciadores") que hacen que sea más probable que las proteínas se plieguen independientemente y se comporten como se esperaba. Especialmente en el caso en que los ligadores permiten la purificación de proteínas, los ligadores en fusiones de proteínas o péptidos a veces están diseñados con sitios de clivaje para proteasas o agentes químicos que permiten la liberación de las dos proteínas separadas. Esta técnica se usa a menudo para la identificación y purificación de proteínas, fusionando una proteína GST, un péptido FLAG o un péptido hexa-his (también conocido como una etiqueta 6xhis) que puede aislarse usando resinas de níquel o cobalto (cromatografía de afinidad).

Las secuencias de aminoácidos para los ectodominios CD33, TLR4 y RAGE adecuados son conocidas y adaptables para su uso en las composiciones y los procedimientos descritos. Por ejemplo, el ectodominio del CD33 de antígeno de superficie celular mieloide *Homo sapiens* (Uniprot P20138[aa. 18-259]) puede presentar la siguiente secuencia de aminoácidos: 18-DPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPIPY DKNSPVHGYW FREGAISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM ERGSTKYSYK SPQLSVHVTDLTHRPKILIP GTLEPGHSGN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTERTIQLN VTYVPQNPTT GIFPGDGS GK QETRAGVVH-259 (SEQ ID NO:1), o un fragmento o variante de la misma, por ejemplo, que presenta una secuencia de aminoácidos con al menos el 65, el 70, el 71, el 72, el 73, el 74, el 75, el 76, el 77, el 78, el 79, el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, donde el fragmento o variante es capaz de unirse a S100A9.

Hay al menos tres polimorfismos de un solo nucleótido ("SNP") conocidos en el ectodominio de CD33 (es decir, W22R, R69G y S128N). Por lo tanto, el dominio extracelular de *Homo sapiens* CD33 puede presentar la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 con uno o más de estos SNP. Por ejemplo, el dominio extracelular de CD33 *Homo sapiens* también puede presentar la siguiente secuencia de aminoácidos: 18-DPN FX₁ LQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPIPY DKNSPVHGYW FREGAISX₂D SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM ERGSTKYX₃YK SPQLSVHVTDLTHRPKILIP GTLEPGHSGN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTERTIQLN VTYVPQNPTT GIFPGDGS GK QETRAGVVH-259, X₁ es W o R; donde X₂ es R o G; y donde X₃ es S o N (SEQ ID NO:2).

En algunos casos, el ectodominio de CD33 contiene solo la región variable de CD33 ("vCD33"). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la porción vCD33 presenta la siguiente secuencia de aminoácidos: 19-PN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPIPY DKNSPVHGYW FREGAISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM ERGSTKYSYK SPQLSVHVTDL-135 (SEQ ID NO:3), o un fragmento o variante de la misma, por ejemplo, que presenta una secuencia de aminoácidos con al menos el 65, el 70, el 71, el 72, el 73, el 74, el 75, el 76, el 77, el 78, el 79, el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, donde el fragmento o variante es capaz de unirse a S100A9. El vCD33 también puede presentar uno o más de los SNP descritos (es decir, W22R, R69G y S128N). Por lo tanto, en algunas realizaciones, la porción vCD33 presenta la siguiente secuencia de aminoácidos: 19-PN FX₁LQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPIPY DKNSPVHGYW FREGAISX₂D SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM ERGSTKYX₃YK SPQLSVHVTDL-135, donde X₁ es W o R; donde X₂ es R o G; y donde X₃ es S o N (SEQ ID NO:4).

El dominio variable de CD33 puede mutarse adicionalmente para crear más sitios de glicosilación con el fin de mejorar la unión a S100A9. Estas mutaciones pueden cribarse *in silico* y/o probarse *in vitro* para evaluar la unión de S100A9.

Los carbohidratos unidos a N están unidos a través de la N-acetilglucosamina y las asparaginas. La secuencia consenso unida a N es Asn-X₁-X₂, donde X₁ es cualquier aminoácido que no sea Pro y X₂ es Ser o Thr. La mayoría de los enlaces covalentes de carbohidratos unidos a O involucran un enlace entre el monosacárido N-acetilgalactosamina y los aminoácidos serina o treonina.

Los ejemplos no limitantes de sitios mutantes estarán, aunque no de manera limitada, en los residuos CD33 que pueden mutarse para crear más sitios de glicosilación incluyen Q26N, P40N, L78T y E84N. Otros residuos pueden ser identificados y probados usando procedimientos de rutina. Por ejemplo, las reacciones proteína-proteína se pueden analizar usando un ensayo de afinidad de unión, como un ensayo que usa resonancia de plasmón superficial (SPR) para detectar interactuantes no etiquetados en tiempo real, por ejemplo, usando un chip sensor Biacore™ (GE Healthcare).

El dominio extracelular del receptor tipo toll 4 (TLR4) *Homo sapiens* (Uniprot O00206 [aa. 24-631]) puede presentar la siguiente secuencia de aminoácidos: 24-ESWEPCV EVVPNITYQC MELNFYKIPD NLPFSTKNLD LSFNPLRHLG

SYSFFSFPEL QVLDLSRCEI QTIEDGAYQS LSHLSTLILT GNPIQSLALG AFSGLSLQK LVAVETNLAS
 LENFPIGHLK TLKELNVAHN LIQSFKLPEY FSNLTNLEHL DLSSNKIQSI YCTDLRVLHQ MPLLNLSLDL
 SLNPMNFIQP GAFKEIRLHK LTLRNNFDSL NVMKTCIQGL AGLEVHRLVL GEFRNEGNLE KFDKSALEGL
 CNLTIEEFRL AYLDYYLDDI IDLFNCLTNV SSFSLVSVTI ERVKDFSYNF GWQHLELVNC KFGQFPTLKL
 5 KSLKRLTFTS NKGGNAFSEV DLPSLEFLDL SRNGLSFKGC CSQSDFGTTS LKYLDLSFNG VITMSSNFLG
 LEQLEHLDLQ HSNLQKMSEF SVFLSLRNL IYLDISHTR VAFNGIFNGL SSLEVLMKAG NSFQENFLPD
 IFTELRLNLT LDLSQCQLEQ LSPTAFNSLS SLQVLNMSHN NFFSLDTFPY KCLNSLQVLD YSLNHIMTSK
 KQELQHFPSS LAFLNLTQND FACTCEHQS LQWIKDQRQL LVEVERMECA TPSDKQGMPV LSLNITCQMN K-631

(SEQ ID NO:5), o un fragmento o variante de la misma, por ejemplo, que presente una secuencia de aminoácidos con
 10 al menos el 65, el 70, el 71, el 72, el 73, el 74, el 75, el 76, el 77, el 78, el 79, el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el
 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de identidad de secuencia con
 la SEQ ID NO:5, donde el fragmento o variante es capaz de unirse a S100A9.

El ectodominio de TLR4 se ha usado anteriormente en una proteína de fusión con factor de diferenciación mieloide 2
 15 (MD-2) para funcionar como una trampa de lipopolisacárido (LPS). El MD-2 es necesario para que el TLR4 se una a
 la LPS. Sin embargo, no es necesario que el TLR4 se una y atrape S100A9. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la
 proteína de fusión que contiene el TLR4 no contiene también el MD-2. En otras realizaciones, la proteína de fusión
 contiene ectodominios TLR4 y CD33.

20 El dominio extracelular del receptor *Homo sapiens* para productos finales de glicación avanzada (RAGE) (número de
 acceso NP_001127 [aa. 23-342]) puede presentar la siguiente secuencia de aminoácidos: 23- AQNITARI
 GEPLVLKCKG APKPPQRLK WKLNTGRTEA WKVLSPQGGG PWDSVARVLP NGSLFLPAVG IQDEGIFRCQ
 AMNRNGKETK SNYRVRVYQI PGKPEIVDSA SELTAGVPNK VGTCVSEGSY PAGTLSWHLG GKPLVPNEKG
 VSVKEQTRRH PETGLFTLQS ELMVTPARGG DPRPTFSCSF SPGLPRHRAL RTAPIQPRVW EPVPLEEVQL
 25 VVEPEGGA VPAQPSPIH WMKDGVLPL PPSPVLILPE IGPQDQGTYS CVATHSSHGP
 QESRAVSISI IEPGEEGPTA GSVGGSGGLT LA-342 (SEQ ID NO:6), o un fragmento o variante de la misma, por
 ejemplo, que presente una secuencia de aminoácidos con al menos el 65, el 70, el 71, el 72, el 73, el 74, el 75, el 76,
 el 77, el 78, el 79, el 80, el 81, el 82, el 83, el 84, el 85, el 86, el 87, el 88, el 89, el 90, el 91, el 92, el 93, el 94, el 95,
 el 96, el 97, el 98 o el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6, donde el fragmento o variante es capaz
 30 de unirse a S100A9.

Los dominios extracelulares de CD33, TLR4 y/o RAGE se expresan como una fusión con regiones constantes de
 cadena pesada de inmunoglobulina, es decir, una región Fc, que contiene dos dominios de región constante y carece
 de la región variable. Dichas fusiones pueden secretarse como moléculas multiméricas en las que las porciones Fc
 35 están unidas por disulfuro entre sí y dos polipéptidos receptores están dispuestos muy cerca uno del otro. Esta
 molécula química se puede producir como proteína de fusión, que se puede formar mediante el acoplamiento
 químico de los polipéptidos constituyentes o se puede expresar como un polipéptido único a partir de la secuencia de
 ácido nucleico que codifica la proteína de fusión contigua única. Una proteína de fusión monocatenaria es una proteína
 de fusión que presenta un esqueleto de polipéptido contiguo único. Las proteínas de fusión se pueden preparar usando
 40 técnicas convencionales en biología molecular para unir los dos genes en el marco en un solo ácido nucleico y, a
 continuación, expresar el ácido nucleico en una célula huésped adecuada en condiciones en las que se produce la
 proteína de fusión. En particular, el inhibidor de CD33/S100A9 puede ser una proteína de fusión química que
 comprende el ectodominio de CD33, TLR4 y/o RAGE y una región constante de cadena pesada (Fc) de
 inmunoglobulina, por ejemplo, de IgG1.

45 El antagonista de CD33/S100A9 contiene al menos 2, 3 o más dominios de unión a S100A9. En algunos casos, el
 antagonista contiene al menos un ectodominio de CD33 y un dominio de unión a S100A9 seleccionado de entre el
 grupo que consiste en un ectodominio TLR4 y un ectodominio RAGE.

50 Múltiples copias de la proteína de fusión también se pueden combinar para formar un complejo multivalente. Por lo
 tanto, en algunas realizaciones, dos o más proteínas de fusión se pueden unir a una molécula o partícula central. En
 su forma más simple, un complejo multivalente comprende un multímero de dos o tres o cuatro o más de las proteínas
 de fusión descritas asociadas (por ejemplo, unidas covalentemente o de otro modo) entre sí, preferentemente a través
 de una molécula ligadora. Las moléculas ligadoras adecuadas incluyen moléculas de unión multivalentes tales como
 55 avidina, estreptavidina y extravidina, cada una de las cuales puede presentar cuatro sitios de unión para biotina.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede biotinilarse. Una vez biotinilada, la proteína de fusión biotinilada
 se puede conjugar con una estreptavidina tetramérica. Las proteínas pueden biotinilarse química o enzimáticamente.
 La biotinilación química usa diversas químicas de conjugación para producir biotinilación inespecífica de aminas,
 60 carboxilatos, sulfhidrilos y carbohidratos. La biotinilación enzimática da como resultado la biotinilación de una lisina
 específica dentro de una secuencia determinada por una biotina ligasa bacteriana. La mayoría de los reactivos de
 biotinilación química consisten en un grupo reactivo unido a través de un conector a la cadena lateral de biotina del

ácido valérico. Este conector también puede mediar la solubilidad de los reactivos de biotinylation; los ligadores que incorporan poli (etilen) glicol (PEG) pueden hacer que los reactivos insolubles en agua sean solubles o aumentar la solubilidad de los reactivos de biotinylation que ya son solubles en cierta medida.

- 5 La biotinylation enzimática se efectúa con mayor frecuencia mediante la unión genética de la proteína de interés en su extremo N, extremo C o en un bucle interno a un péptido aceptor de biotina de 15 aminoácidos, también denominado AviTag™ o péptido aceptor (AP). La proteína marcada se incuba con biotina ligasa (BirA) en presencia de biotina y ATP. La biotinylation enzimática se puede efectuar in vitro, pero BirA también reacciona específicamente con su péptido diana dentro de las células de mamíferos y bacterias y en la superficie celular, mientras que otras
- 10 proteínas celulares no se modifican. Por lo tanto, la proteína de fusión puede contener además un péptido aceptor de biotina que puede biotinilarse con BirA en presencia de biotina y ATP. Por ejemplo, la porción Fc puede biotinilarse enzimáticamente usando el sistema AviTag™ (Avidity, LLC, Aurora, Colorado), que involucra incorporar una secuencia de péptidos de 15 aminoácidos en la proteína de fusión quimérica que puede biotinilarse mediante la enzima BirA de *E. coli*. En algunas realizaciones, este péptido aceptor de biotina presenta la secuencia de aminoácidos
- 15 GLNDIFEAQKIEWHE (SEQ ID NO:7).

Los oligonucleótidos se biotinilan fácilmente en el curso de la síntesis de oligonucleótidos por el procedimiento de fosforamidita usando fosforamidita de biotina. Tras la desprotección estándar, los conjugados obtenidos se pueden purificar usando HPLC de fase inversa o de intercambio aniónico.

- 20 En otras realizaciones, dos o más proteínas de fusión se conjugan con la superficie de un liposoma u otra micropartícula para formar el complejo multivalente. Varios informes describen la unión de los anticuerpos a los liposomas. Por ejemplo, el documento de los EE.UU. 5.620.689 describe los denominados "inmunoliposomas" en los que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos efectivos para unirse a un antígeno elegido en un linfocito B o un
- 25 linfocito T, se unen a los extremos distales de los lípidos de la membrana en los liposomas que presentan un recubrimiento superficial de cadenas de polietilenglicol. En algunas realizaciones, los complejos multivalentes descritos que comprenden inmunoliposomas que contienen anticuerpos, los cuales se unen específicamente a las proteínas de fusión descritas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden unirse a la porción Fc de la proteína de fusión, o etiquetarse en la proteína, como el péptido aceptor de biotina.

- 30 El complejo multivalente puede ser homogéneo, es decir que contiene múltiples copias de un tipo de una proteína de fusión, o puede ser heterogéneo. Por ejemplo, el complejo multivalente puede contener combinaciones de proteínas de fusión CD33 y TLR4 de la invención. El complejo multivalente contiene proteínas de fusión multivalentes, es decir, al menos dos proteínas de fusión que contienen dos o más dominios de unión a S100A9.

- 35 Las proteínas de fusión quiméricas descritas también pueden contener secuencias ligadoras de péptidos que conectan uno o más ectodominios CD33 y/o TLR4 entre sí, a la porción Fc, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el conector peptídico puede presentar la secuencia de aminoácidos DIEGRMD (SEQ ID NO:8).

- 40 En otros ejemplos que también se describen en esta invención, el inhibidor de CD33/S100A9 se une a e inhibe el receptor CD33 endógeno en las MDSC. Por ejemplo, el inhibidor de CD33/S100A9 puede ser una proteína recombinante que se une a CD33 sin activar las MDSC y compite por la unión del S100A9 endógeno (por ejemplo, una variante mutante o truncada de S100A9).

45 **Anticuerpos**

- Los anticuerpos que pueden usarse en las composiciones y procedimientos descritos incluyen inmunoglobulina completa (es decir, un anticuerpo intacto) de cualquier clase, fragmentos de la misma y proteínas sintéticas que contienen al menos el dominio variable de unión a antígeno de un anticuerpo. Los dominios variables difieren en la
- 50 secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, por lo general, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme en los dominios variables de los anticuerpos. Típicamente, se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes mejor conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Cada uno de
- 55 los dominios variables de cadenas pesada y ligera naturales comprende cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta, conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas de cerca mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos.

- 60 También se describen fragmentos de anticuerpos que presentan bioactividad. Los fragmentos, ya estén unidos a otras secuencias o no, incluyen inserciones, delecciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones

particulares o residuos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del fragmento no se altere o deteriore significativamente, en comparación con el anticuerpo o fragmento del mismo sin modificar.

Las técnicas también se pueden adaptar para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para una proteína antigénica de la presente descripción. Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para la producción de anticuerpos monocatenarios. Se puede crear un anticuerpo monocatenario fusionando los dominios variables de las cadenas pesada y ligera usando un conector peptídico corto, reconstituyendo así un sitio de unión a antígeno en una molécula única. Se han desarrollado fragmentos variables de anticuerpos monocatenarios (scFvs) en los que el extremo C de un dominio variable está unido al extremo N del otro dominio variable a través de un péptido o conector de 15 a 25 aminoácidos sin alterar significativamente la unión al antígeno o la especificidad de la unión. El ligador se elige para permitir que la cadena pesada y la cadena ligera se unan en su orientación conformacional adecuada.

Los fragmentos variables monocatenarios divalentes (di-scFvs) se pueden diseñar uniendo dos scFvs. Esto se puede hacer produciendo una sola cadena peptídica con dos regiones VH y dos regiones VL, produciendo scFvs en tandem. Los ScFvs también se pueden diseñar con péptidos ligadores que son demasiado cortos para que las dos regiones variables se plieguen (aproximadamente cinco aminoácidos), lo que obliga a los scFvs a dimerizarse. A este tipo se lo conoce como diacuerpos. Se ha demostrado que los diacuerpos presentan constantes de disociación hasta 40 veces más bajas que los scFv correspondientes, lo que significa que presentan una afinidad mucho mayor con su diana. Los enlazadores más cortos (uno o dos aminoácidos) provocan la formación de trímeros (triacuerpos o tricuerpos). También se han producido tetracuerpos. Presentan una afinidad incluso mayor por sus dianas que los diacuerpos.

Aptámeros

El término "aptámero" se refiere a las moléculas de ácido oligonucleico o péptido que se unen a una molécula diana específica. Estas moléculas generalmente se seleccionan de entre un grupo de secuencias aleatorias. Los aptámeros seleccionados son capaces de adaptar estructuras terciarias únicas y reconocer moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Un "aptámero de ácido nucleico" es un ácido oligonucleico de ADN o ARN que se une a una molécula diana a través de su conformación, y por lo tanto inhibe o suprime las funciones de dicha molécula. Un aptámero de ácido nucleico puede estar constituido por ADN, ARN o una combinación de los mismos. Un "aptámero peptídico" es una molécula de proteína combinatoria con una secuencia peptídica variable insertada dentro de una proteína de andamiaje constante. La identificación de aptámeros peptídicos se efectúa típicamente en condiciones estrictas de dihíbrido de levadura, lo que aumenta la probabilidad de que los aptámeros peptídicos seleccionados se expresen de forma estable y se plieguen correctamente en un contexto intracelular.

Los aptámeros de ácido nucleico son típicamente oligonucleótidos que varían de 15 a 50 bases de longitud, que se pliegan en estructuras secundarias y terciarias definidas, como bucles de tallo o cuartetos G. Los aptámeros de ácido nucleico se unen preferentemente a la molécula diana con una K_d menos de 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , o 10^{-12} . Los aptámeros de ácido nucleico también pueden unirse a la molécula diana con un grado muy alto de especificidad. Se prefiere que los aptámeros de ácido nucleico tengan una K_d con la molécula diana al menos 10, 100, 1.000, 10.000 o 100.000 veces más baja que la K_d de otras moléculas no dirigidas.

Los aptámeros de ácido nucleico se aíslan típicamente de bibliotecas complejas de oligonucleótidos sintéticos mediante un procedimiento iterativo de adsorción, recuperación yreamplificación. Por ejemplo, los aptámeros de ácido nucleico pueden prepararse usando el procedimiento SELEX (Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial). El procedimiento SELEX involucra seleccionar una molécula de ARN unida a una molécula diana de un conjunto de ARN compuesto de moléculas de ARN, cada una de las cuales presenta regiones de secuencia aleatoria y regiones de unión a un cebador en ambos extremos de la misma, amplificando la molécula de ARN recuperada mediante RT-PCR, efectuando la transcripción con el uso de la molécula de ADNc obtenida como plantilla y el resultado como un conjunto de ARN para el procedimiento posterior. Dicho procedimiento se repite desde varias veces hasta varias decenas de veces a fin de seleccionar un ARN con una capacidad más fuerte para unirse a una molécula diana. Las longitudes de secuencia de base de la región de secuencia aleatoria y la región de unión del cebador no están particularmente limitadas. En general, la región de secuencia aleatoria contiene aproximadamente de 20 a 80 bases y la región de unión del cebador contiene aproximadamente de 15 a 40 bases. La especificidad para una molécula diana puede mejorarse mezclando prospectivamente moléculas similares a la molécula diana con grupos de ARN y usando un grupo que contiene moléculas de ARN que no se unen a la molécula de interés. Una molécula de ARN que se obtuvo como producto final mediante dicha técnica se usa como un aptámero de ARN. Una base de datos de aptámeros que contiene información de secuencia completa sobre aptámeros y ribozimas no naturales que han sido generadas mediante procedimientos de selección *in vitro* se encuentra disponible en aptamer.icmb.utexas.edu.

Un aptámero de ácido nucleico generalmente presenta mayor especificidad y afinidad por una molécula diana que por

un anticuerpo. En consecuencia, un aptámero de ácido nucleico puede unirse específica, directa y firmemente a una molécula diana. Dado que el número de residuos de aminoácidos diana necesarios para la unión puede ser menor que el de un anticuerpo, por ejemplo, un aptámero de ácido nucleico es superior a un anticuerpo, cuando se pretende la supresión selectiva de funciones de una proteína dada entre proteínas altamente homólogas.

- 5 Los aptámeros de ácido nucleico no modificados se eliminan rápidamente del torrente sanguíneo, con una vida media de minutos a horas, principalmente debido a la degradación de la nucleasa y la eliminación del cuerpo por los riñones, como resultado del peso molecular inherentemente bajo del aptámero. Este rápido despeje puede ser una ventaja en aplicaciones como el diagnóstico por imágenes *in vivo*. Sin embargo, varias modificaciones, como las pirimidinas
- 10 sustituidas con flúor 2', el enlace de polietilenglicol (PEG), etc., están disponibles para aumentar la vida media en suero de los aptámeros al día o, incluso, a la semana.

- Otro enfoque para aumentar la resistencia a la nucleasa de los aptámeros es usar un Spiegelmer. Los Spiegelmers son moléculas similares al ácido ribonucleico (ARN) construidas a partir de los L-ribonucleótidos no naturales. Los
- 15 Spiegelmers son, por lo tanto, imágenes especulares estereoquímicas (enantiómeros) de oligonucleótidos naturales. Al igual que otros aptámeros, los Spiegelmers pueden unir moléculas diana, como las proteínas. La afinidad de los Spiegelmers con sus moléculas diana a menudo se encuentra en el rango pico a nanomolar y, por consiguiente, es comparable con los anticuerpos. A diferencia de otros aptámeros, los Spiegelmers presentan una alta estabilidad en el suero sanguíneo, ya que son menos susceptibles de ser escindidos hidrolíticamente mediante enzimas. Sin
- 20 embargo, son excretados por los riñones en poco tiempo debido a su baja masa molar. A diferencia de otros aptámeros, los Spiegelmers pueden no ser producidos directamente por el procedimiento SELEX. Esto se debe a que los ácidos L-nucleicos no son abordables para los procedimientos enzimáticos, como la reacción en cadena de la polimerasa. En cambio, la secuencia de un aptámero natural identificado por el procedimiento SELEX se determina y, a continuación, se usa en la síntesis artificial de la imagen especular del aptámero natural.

- 25 Los aptámeros peptídicos son proteínas diseñadas para interferir con otras interacciones proteicas dentro de las células. Consisten en un bucle de péptido variable unido en ambos extremos a un andamio. Esta doble restricción estructural aumenta en gran medida la afinidad de unión del péptido aptámero a niveles comparables con un anticuerpo.

- 30 La longitud variable del bucle se compone típica y aproximadamente de diez a veinte aminoácidos, y el andamio puede ser cualquier proteína que tenga buena solubilidad. Actualmente, la proteína bacteriana Tiorredoxina-A es la proteína de andamiaje más usada, con el bucle variable siendo insertado dentro del sitio activo reductor y las dos cadenas laterales de cisteínas pudiendo formar un puente disulfuro.

- 35 La selección del aptámero peptídico se puede hacer usando diferentes sistemas, pero el más usado actualmente es el sistema de dos híbridos de levadura. El aptámero peptídico también se puede seleccionar de entre bibliotecas combinatorias de péptidos construidas mediante visualización de fagos y otras tecnologías de visualización de superficie, tales como la visualización de ARNm, la visualización de ribosomas, la visualización bacteriana y la
- 40 visualización de levadura. Estos procedimientos experimentales también se conocen como biopanning. Entre los péptidos obtenidos de biopanning, los mimotopos pueden considerarse como un tipo de aptámeros peptídicos. Todos los péptidos obtenidos de bibliotecas de péptidos combinatorios se han almacenado en una base de datos especial con el nombre MimoDB.

45 **Composición farmacéutica**

- Las composiciones descritas pueden usarse terapéuticamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable", se entiende un material que no es biológicamente, o de otro modo, no deseable, es decir, el material se administra a un sujeto sin provocar efectos biológicos no deseados o interactuar de
- 50 manera perjudicial con los demás componentes de la composición farmacéutica en la que se encuentra incluido. El vehículo se seleccionaría naturalmente para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como bien sabría un experto en la materia.

- Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy
- 55 (19ª ed.) Ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Típicamente, se usa una cantidad adecuada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, entre otros, una solución salina, una solución de Ringer y una solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de alrededor de 5 a alrededor de 8 y, más preferentemente, de alrededor de 7 a alrededor de 7,5. Los vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación
- 60 sostenida, tales como las matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices presentan la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para los expertos en la técnica que determinados vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por

ejemplo, la vía de administración y la concentración de la composición que se administra.

Los vehículos farmacéuticos resultan conocidos para los expertos en la materia. Estos serían típicamente vehículos estándares para la administración de medicamentos a humanos, incluyendo las soluciones como agua estéril, solución salina y soluciones tamponadas a un pH fisiológico. Las composiciones pueden administrarse por vía intramuscular o subcutánea. Otros compuestos se administrarán según los procedimientos estándares usados por los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares, además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos, tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. El propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo son ejemplos de solventes no acuosos. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, lo que incluye medios salinos y amortiguados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de sodio y dextrosa, Ringer lactado o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluidos y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. Los conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, bolsitas o tabletas. Los espesantes, saborizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispensación o aglutinantes pueden ser deseables.

Algunas de las composiciones pueden administrarse potencialmente como una sal de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico, o por reacción con una base inorgánica como el hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialkil y arilaminas y etanolaminas sustituidas.

Procedimientos de tratamiento

También se describen procedimientos para tratar una enfermedad en un sujeto, provocada o exacerbada por la actividad de S100A9, que comprende administrar al sujeto una composición que comprende un antagonista de CD33/S100A9 descrito en esta invención.

El sistema inmune innato es crucial para el inicio y la amplificación de las respuestas inflamatorias. Durante este procedimiento, los fagocitos son activados por PAMP reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Los fagocitos también se activan mediante señales de peligro endógenas llamadas alarmas o DAMP a través de PRR parcialmente específicos y parcialmente comunes. Dos miembros de la familia de proteínas S100, S100A8 y S100A9, se han identificado recientemente como DAMP endógenos importantes. El complejo de S100A8 y S100A9 (también llamado calprotectina) se secreta activamente durante la respuesta al estrés de los fagocitos. Estas moléculas se han identificado como activadoras endógenas de TLR4 y se ha demostrado que promueven el choque letal inducido por endotoxinas. Es importante destacar que S100A8/S100A9 no solo participa en la promoción de la respuesta inflamatoria en las infecciones, sino que también se identificó como un potente amplificador de la inflamación en la autoinmunidad, así como en el desarrollo del cáncer y la propagación del tumor. Esta acción proinflamatoria de S100A8/S100A9 involucra mecanismos autocrinos y paracrinos en fagocitos, endotelio y otras células. Como resultado neto, se incrementa la extravasación de leucocitos en tejidos inflamados y su activación posterior. Por consiguiente, S100A8/S100A9 desempeña un papel fundamental durante la amplificación de la inflamación.

Las enfermedades asociadas con la actividad de S100A8/S100A9 incluyen, entre otras, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, artritis psoriásica, sepsis, aterosclerosis, síndrome coronario agudo/infarto de miocardio, diabetes, psoriasis/enfermedad inflamatoria de la piel, enfermedad inflamatoria intestinal, vasculitis, rechazo de trasplante, LES/glomerulonefritis, pancreatitis, cáncer, dermatomiositis/polimiositis e hipercincemia/inflamación sistémica. Además, las enfermedades caracterizadas por infecciones recurrentes, hepatoesplenomegalia, anemia, vasculopatía, úlceras cutáneas concomitantes e inflamación sistémica se definen mediante niveles extraordinariamente altos de S100A8/S100A9 en fluidos extracelulares.

En algunas realizaciones, el uso de la invención involucra el tratamiento de una infección y/o evitar la sepsis en un paciente que lo necesita. La sepsis es provocada por la respuesta del sistema inmunitario a una infección grave, más comúnmente bacterias, pero también hongos, virus y parásitos en la sangre, el tracto urinario, los pulmones, la piel u otros tejidos. Hay varios factores microbianos que pueden provocar la típica cascada inflamatoria séptica. Un patógeno invasor es reconocido por su patrón molecular asociado al patógeno (PAMP). Ejemplos de PAMP son lipopolisacáridos (LPS) en bacterias Gram-negativas, flagelina en bacterias Gram-negativas, dipéptido de muramil en la pared celular de peptidoglicano de una bacteria Gram-positiva y ADN bacteriano CpG. Estos PAMP son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) del sistema inmune innato. Hay cuatro familias de PRR: los receptores de tipo toll, los receptores de lectina de tipo C, los receptores de tipo dominio de oligomerización de nucleótidos y las helicasas RigI. El S100A8/S100A9 actúa como un ligando TLR4 endógeno involucrado en la amplificación de los efectos de LPS en los fagocitos aguas arriba de TNF- α . Aunque el TNF- α es crítico para la toxicidad de los LPS, el bloqueo de TNF- α presentó un efecto nocivo en lugar de protector en la sepsis humana. Además, en un pequeño estudio, se demostró que los niveles de S100A8/S100A9 disminuyeron en los pacientes sobrevivientes durante la recuperación de la sepsis, y los no sobrevivientes se caracterizaron por niveles séricos altos de S100A8/S100A9. La sepsis generalmente se trata con líquidos intravenosos y antibióticos. El antagonista de CD33/S100A9 descrito puede usarse en lugar de, o además de, los antibióticos intravenosos.

En algunas realizaciones, el uso de la invención involucra el tratamiento de una enfermedad inflamatoria y/o autoinmune en un paciente que lo necesita. El S100A8/S100A9 contribuye a la patogénesis de diferentes tipos de artritis. El S100A8/S100A9 derivado de macrófagos amplifica la respuesta inflamatoria en la artritis inducida por antígenos y también actúa como DAMP endógeno en ausencia de infección o agentes patógenos. La autoinmunidad es la falla de un organismo en reconocer sus propias partes constituyentes como sí mismas, conduciendo, por consiguiente, a una respuesta inmune contra sus propias células y tejidos. Cualquier enfermedad que dé como resultado tal respuesta inmunitaria aberrante se denomina enfermedad autoinmune o autoinflamatoria. Las enfermedades autoinmunes o autoinflamatorias comparten características comunes por el hecho de que ambos grupos de trastornos resultan del sistema inmune que ataca los propios tejidos del cuerpo y también dan como resultado una mayor inflamación. Entre los ejemplos más destacados se incluyen la enfermedad celíaca, diabetes mellitus tipo 1 (DM1D), sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren, síndrome de Churg-Strauss, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Addison, artritis reumatoide (AR), artritis gotosa, polimiositis (PM), dermatomiositis (DM), enfermedad de injerto contra huésped, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, enfermedades inflamatorias del intestino como enfermedad de Crohn, colitis, colitis atípica, colitis química; colitis colágena, colitis distal, colitis de derivación: colitis fulminante, colitis indeterminada, colitis infecciosa, colitis isquémica, colitis linfocítica, colitis microscópica, gastroenteritis, enfermedad de Hirschsprung, enfermedades digestivas inflamatorias, Morbus Crohn, enfermedades digestivas crónicas o no crónicas o enfermedades digestivas inflamatorias crónicas; enteritis regional y colitis ulcerosa, anemia hemolítica autoinmune, esterilidad, miastenia gravis, esclerosis múltiple, enfermedad de Basedow, púrpura trombopenia, diabetes mellitus insulino dependiente, alergia; asma, enfermedad atópica; arteriosclerosis; miocarditis; cardiomiopatía; nefritis glomerular; anemia hipoplásica; rechazo después del trasplante de órganos y numerosas neoplasias de pulmón, próstata, hígado, ovario, colon, cuello uterino, tejidos linfáticos y mamaros, psoriasis, acné vulgar, asma, enfermedades autoinmunes, enfermedad celíaca, próstatas crónicas, glomerulonefritis, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedad inflamatoria pélvica, sarcoidosis por lesión por reperfusión, vasculitis, cistitis intersticial, hipersensibilidad tipo 1, esclerosis sistémica, dermatomiositis, polimiositis y miositis por cuerpos de inclusión y alergias. Los tratamientos para la enfermedad autoinmune han sido tradicionalmente inmunosupresores, antiinflamatorios (esteroides) o paliativos. Las terapias no inmunológicas, como el reemplazo hormonal en la tiroiditis de Hashimoto o la diabetes mellitus tipo 1, tratan los resultados de la respuesta autoagresiva, por consiguiente, estos son tratamientos paliativos. La manipulación de la dieta limita la gravedad de la enfermedad celíaca. El tratamiento con esteroides o AINE limita los síntomas inflamatorios de muchas enfermedades. La inmunoglobulina intravenosa (IVIG) se usa para la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) y el síndrome de Guillain-Barré (GBS). Se ha demostrado que las terapias inmunomoduladoras específicas, tales como los antagonistas del TNF α (por ejemplo, Etanercept), el agente reductor de las células B rituximab, el receptor anti-IL-6 tocilizumab y el bloqueador de coestimulación abatacept son útiles para tratar la AR. Algunas de estas inmunoterapias pueden estar asociadas con un mayor riesgo de efectos adversos, como la susceptibilidad a la infección. El antagonista de CD33/S100A9 descrito puede usarse en lugar de, o además de, estos tratamientos existentes.

En algunas realizaciones, el uso de la invención involucra el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurodegenerativo en un paciente que lo necesita. Como se usa en esta invención, "enfermedad neurodegenerativa" incluye la enfermedad neurodegenerativa asociada a la agregación de proteínas, también denominada "trastornos de agregación de proteínas", "trastornos de conformación de proteínas" o "proteínopatías". Las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la agregación de proteínas incluyen enfermedades o trastornos caracterizados por la formación de agregados de proteínas intracelulares perjudiciales (por ejemplo, inclusiones en el citosol o núcleo) o

agregados de proteínas extracelulares (por ejemplo, placas). La "agregación de proteínas perjudicial" es la acumulación, oligomerización, fibrilación o agregación no deseable y perjudicial de dos o más proteínas o péptidos hetero u homoméricos. Se puede depositar un agregado proteico perjudicial en cuerpos, inclusiones o placas, cuyas características a menudo son indicativas de enfermedad y contienen proteínas específicas de la enfermedad. Por ejemplo, los agregados de superóxido dismutasa-1 están asociados con la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), los agregados de poli-Q están asociados con la enfermedad de Huntington y los cuerpos de Lewy que contienen sinucleína α están asociados con la enfermedad de Parkinson.

Las enfermedades neurológicas también están asociadas con la falla inmune relacionada con niveles crecientes de factores provocantes de enfermedades que exceden la capacidad del sistema inmune de contener, o una situación en la que la función inmune se deteriora o se suprime concomitantemente con la progresión de la enfermedad, debido a factores indirecta o directamente relacionados con la entidad que provoca la enfermedad. Las MDSC pueden provocar deficiencia de células T al suprimir la actividad de las células T efectoras, promoviendo, por consiguiente, la enfermedad neurodegenerativa asociada a la falla inmune.

Los ejemplos representativos de trastornos de agregación de proteínas o proteopatías incluyen trastornos conformacionales de proteínas, alfa-sinucleinopatías, enfermedades de poliglutamina, serpinopatías, taupatías u otros trastornos relacionados. Otros ejemplos de enfermedades neurológicas son, o incluyen, entre otros, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Parkinson (EP), atrofia muscular espinal (AME), enfermedad de Alzheimer (EA), demencia difusa de cuerpos de Lewy (DLBD), atrofia multisistémica (MSA), distrofia miotónica, atrofia dentatorubro-pallidoluisiana (DRPLA), ataxia de Friedreich, síndrome X frágil, retraso mental XE frágil, enfermedad de Machado-Joseph (MJD o SCA3), atrofia muscular espinobulbar (también conocida como enfermedad de Kennedy), gen de ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1), ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6), ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA7), ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17), enfermedades hepáticas crónicas, encefalopatía familiar con cuerpos de inclusión de neuroserpin (FENIB), enfermedad de Pick, degeneración corticobasal (CBD), parálisis supranuclear progresiva (PSP), complejo de esclerosis lateral amiotrófica/parkinsonismo, demencia, catarata, serpinopatías, anemia hemolítica, fibrosis quística, enfermedad de Wilson, neurofibromatosis tipo 2, neuropatías periféricas desmielinizantes, retinitis pigmentosa, síndrome de Marfan, enfisema, fibrosis pulmonar idiopática, demencia de grano arofófilo, degeneración corticobasal, ovillos neurofibrilares difusos con calcificación, demencia frontotemporal ligada a la demencia del cromosoma 17, enfermedad de Hallervorden-Spatz, enfermedad de Nieman-Pick tipo C, panencefalitis esclerosante subaguda, trastornos cognitivos que incluyen demencia (asociada a la enfermedad de Alzheimer, isquemia, trauma, problemas vasculares o derrame cerebral, enfermedad del VIH, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, Creutzfeldt- Enfermedad de Jacob, hipoxia perinatal, otras condiciones médicas generales o abuso de sustancias); delirio, trastornos amnésicos o deterioro cognitivo relacionado con la edad; trastornos de ansiedad que incluyen trastorno de estrés agudo, agorafobia, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo compulsivo, ataque de pánico, trastorno de pánico, trastorno de estrés postraumático, trastorno de ansiedad por separación, fobia social, fobia específica, trastorno de ansiedad inducido por sustancias y ansiedad debido a una afección médica general; esquizofrenia o psicosis, incluida la esquizofrenia (paranoide, desorganizada, catatónica o indiferenciada), trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delirante, trastorno psicótico breve, trastorno psicótico compartido, trastorno psicótico debido a una afección médica general y trastorno psicótico inducido por sustancias; trastornos relacionados con sustancias y comportamientos adictivos (incluidos delirio inducido por sustancias, demencia persistente, trastorno amnésico persistente, trastorno psicótico o trastorno de ansiedad; tolerancia, dependencia o abstinencia de sustancias que incluyen alcohol, anfetaminas, cannabis, cocaína, alucinógenos, inhalantes, nicotina, opioides, fenciclidina, sedantes, hipnóticos o ansiolíticos); trastornos del movimiento, que incluyen acinesias y síndromes acinéuticos rígidos (incluida la enfermedad de Parkinson, parkinsonismo inducido por fármacos, parkinsonismo postencefálico, parálisis supranuclear progresiva, degeneración corticobasal, complejo de demencia ALS parkinsonismo y calcificación de ganglios basales), parkinsonismo inducido por medicamentos (como neuroléptico) parkinsonismo inducido, síndrome neuroléptico maligno, distonía aguda inducida por neurolépticos, acatisia aguda inducida por neurolépticos, discinesia tardía inducida por neurolépticos y temblor postural inducido por medicamentos), síndrome de Gilles de la Tourette, epilepsia y discinesias, incluido temblor de reposo, temblor postural y temblor intencional), corea (como corea de Sydenham, enfermedad de Huntington, corea hereditaria benigna, neuroacantocitosis, corea sintomática, corea inducida por fármacos y hemiballismo), mioclono (incluyendo mioclono generalizado y mioclono focal), tics (incluyendo tics simples, tics complejos y tics sintomáticos) y distonía (incluyendo distonía generalizada, como distonía yodipática, distonía inducida por fármacos, distonía sintomática y distonía paroxística, y distonía focal como blefaroespasma, distonía oromandibular, distonía espasmódica, tortícolis espasmódica, distonía axial, calambre del escritor distónico y distonía hemipléjica; obesidad, bulimia nerviosa y trastornos alimentarios compulsivos; dolor que incluye dolor de huesos y articulaciones (osteoartritis), dolor de movimiento repetitivo, dolor dental, dolor de cáncer, dolor miofacial (lesión muscular, fibromialgia), dolor perioperatorio (cirugía general, ginecológica), dolor crónico, dolor neuropático, dolor postraumático, trigémino neuralgia, migraña y dolor de cabeza por migraña; obesidad o trastornos alimentarios asociados con la ingesta excesiva de alimentos y las complicaciones asociadas con ellos; trastorno hiperactivo y déficit

de atención; trastorno de conducta; trastornos del estado de ánimo, incluyendo trastornos depresivos, trastornos bipolares, trastornos del estado de ánimo debidos a una afección médica general y trastornos del estado de ánimo inducidos por sustancias; espasmos musculares y trastornos asociados a una espasticidad muscular o debilidad, incluyendo temblores; incontinencia urinaria; la esclerosis lateral amiotrófica; daño neuronal que incluye daño ocular, 5 retinopatía o degeneración macular del ojo, pérdida auditiva o tinnitus; emesis, edema cerebral y trastornos del sueño, incluyendo la narcolepsia y la apoptosis de las neuronas motoras. Ejemplos ilustrativos del dolor neuropático incluyen la polineuropatía diabética, la neuropatía por atrapamiento, el dolor fantasma, el dolor talámico después del accidente cerebrovascular, la neuralgia posherpética, el dolor de la neuralgia facial atípica después de la extracción del diente y similares, la lesión de la médula espinal, la neuralgia del trigémino y el dolor por cáncer resistente a los analgésicos 10 narcóticos, como la morfina. El dolor neuropático incluye el dolor provocado por daño nervioso central o periférico. E incluye el dolor provocado por la mononeuropatía o la polineuropatía.

En algunos ejemplos, el procedimiento involucra mejorar la respuesta inmune del tumor en un paciente que lo necesita. La expresión de S100A8/S100A9 aumenta en pacientes con diversos tumores. Se cree que los factores solubles 15 secretados por las células tumorales inducen la sobreexpresión de S100A8/S100A9, lo que resulta en una mayor generación de MDSC. Estas MDSC pueden inhibir las respuestas antitumorales de las células T CD8+ y, por consiguiente, promover el crecimiento tumoral. El cáncer de los procedimientos descritos puede ser cualquier célula en un sujeto que experimente crecimiento, invasión o metástasis no regulados. En algunos aspectos, el cáncer puede ser cualquier neoplasia o tumor para el cual se usa actualmente la radioterapia. En algunos aspectos, el cáncer puede 20 ser cualquier tumor que sea resistente a la terapia estándar de atención. Por consiguiente, también se describen procedimientos para sensibilizar tumores a la terapia de atención estándar, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto o composición como se describe en esta invención. Por ejemplo, el cáncer puede ser una neoplasia o tumor que no es lo suficientemente sensible a la radioterapia usando procedimientos estándares. Por consiguiente, el cáncer puede ser un sarcoma, linfoma, leucemia, carcinoma, blastoma o tumor de células 25 germinales. Una lista representativa, aunque no limitante, de cánceres que pueden tratar las composiciones descritas incluyen: linfoma, linfoma de células B, linfoma de células T, micosis fungoide, enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer del sistema nervioso, cáncer de cabeza y del sistema nervioso, cáncer de cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de riñón, cánceres de pulmón, como 30 cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, neuroblastoma/glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de hígado, melanoma, carcinomas de células escamosas de la boca, garganta, laringe y pulmón, cáncer de colon, cáncer cervical, carcinoma cervical, cáncer de mama, cáncer epitelial, cáncer renal, cáncer genitourinario, cáncer pulmonar, carcinoma esofágico, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer de intestino grueso, cánceres hematopoyéticos; cáncer testicular; cánceres de colon y recto, cáncer de próstata y cáncer de páncreas. El antagonista de CD33/S100A9 descrito puede usarse en 35 lugar de, o además de, fármacos antineoplásicos existentes y/o tratamientos de radiación.

Como se describe en esta invención, las MDSC LIN⁺HLA-DR⁺CD33⁺ se acumulan específicamente en la MO de pacientes con síndromes mielodisplásicos (MDS) y deterioran la hematopoyesis a través de un mecanismo que involucra al S100A9 como un ligando endógeno para la señalización iniciada por CD33. Por lo tanto, el procedimiento 40 descrito puede involucrar el tratamiento del MDS en un paciente que lo necesite. Los síndromes mielodisplásicos (MDS) son afecciones médicas hematológicas (relacionadas con la sangre) con producción inefectiva (o displasia) de la clase de células sanguíneas mieloides. En algunos casos, el paciente con MDS presenta una delección cromosómica 5q (del(5q)). Sin embargo, en otros casos, el paciente presenta MDS no del5q. Aunque tres agentes están aprobados para el tratamiento del MDS en los Estados Unidos (EE.UU.), la lenalidomida (LEN) representa el único tratamiento 45 terapéutico dirigido. Por lo tanto, el antagonista de CD33/S100A9 descrito puede usarse en lugar de, o además de, lenalidomida.

En algunas realizaciones, el uso de la invención involucra tratar la anemia de una enfermedad crónica (incluida la anemia relacionada con el cáncer) en un paciente, lo que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una 50 composición, como se describe en esta invención.

Administración

Los inhibidores de CD33/S100A9 descritos pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente efectiva a un 55 sujeto para tratar una enfermedad provocada o exacerbada por la actividad de S100A9. Las composiciones descritas, que incluyen la composición farmacéutica, se pueden administrar de varias maneras, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico, y del área a tratar. Por ejemplo, las composiciones descritas pueden administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavitaria o transdérmica. Las composiciones pueden administrarse por vía oral, parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), por inyección intramuscular, por inyección 60 intraperitoneal, transdérmica, extracorpórea, oftálmica, vaginal, rectal, intranasal, tópica o similar, incluida la administración intranasal tópica o la administración por inhalación.

La administración parenteral de la composición, si se usa, generalmente se caracteriza por su inyección. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución de la suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque revisado para la administración parenteral involucra el uso de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida de modo que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 3,610,795.

Las composiciones descritas en esta invención pueden administrarse profilácticamente a pacientes o sujetos con riesgo de padecer un MDS. Por consiguiente, el procedimiento descrito puede comprender además identificar un sujeto en riesgo de padecer un MDS antes de la administración de las composiciones descritas en esta invención.

10

La cantidad exacta de las composiciones requeridas variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad del trastorno alérgico a tratar, el ácido nucleico o vector particular usado, su modo de administración y similares. Por consiguiente, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar una cantidad adecuada usando solo la experimentación de rutina dada las enseñanzas de esta invención. Por ejemplo, las dosis efectivas y los programas para administrar las composiciones pueden determinarse empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de la habilidad en la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son los suficientemente grandes como para producir el efecto deseado en el que se produce el trastorno de los síntomas. La dosificación no debería ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas y similares. En general, la dosificación variará con la edad, el estado, el sexo y la extensión de la enfermedad en el paciente, la vía de administración o si se incluyen otros medicamentos en el régimen, y un experto en la materia puede determinarlo. La dosis puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar, y puede administrarse en una o más administraciones de dosis diariamente, durante uno o varios días. En la bibliografía hay una orientación con respecto a las dosificaciones adecuadas para clases determinadas de productos farmacéuticos. Por ejemplo, se puede encontrar orientación en la selección de dosis adecuadas para anticuerpos en la literatura sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone y col., editores: Noyes Publications, Park Ridge, NJ, (1985) cap. 22 y páginas 303-357; Smith y col., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber y col., editores: Raven Press, Nueva York (1977) páginas 365-389. Una dosis diaria típica del anticuerpo usado solo puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

Procedimientos de cribado

En esta invención también se describe un procedimiento para identificar un agente que puede usarse para tratar el MDS en un sujeto. El procedimiento puede comprender proporcionar una muestra que comprenda CD33 y S100A9 en condiciones que permitan la unión de CD33 y S100A9, poner en contacto la muestra con un agente candidato, detectar el nivel de unión de CD33/S100A9 y comparar el nivel de unión con un control, donde una disminución en la unión de CD33/S100A9, en comparación con el control, identifica un agente que puede usarse para tratar una enfermedad inflamatoria.

La unión de S100A9 a CD33 se puede detectar usando procedimientos de rutina, como los procedimientos de inmunodetección, que no alteran la unión de proteínas. Los procedimientos pueden ser ensayos basados en células o libres de células. En la literatura científica, se han descrito las etapas de varios procedimientos útiles de inmunodetección, como, por ejemplo, Maggio y col., Enzyme-Immunoassay, (1987) y Nakamura, y col., Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems, Handbook of Experimental Immunology, Volumen 1: Immunochemistry, 27.1-27.20 (1986). Los inmunoensayos, en su sentido más simple y directo, son ensayos de unión que involucran la unión entre anticuerpos y antígeno. Se conocen muchos tipos y formatos de inmunoensayos y todos son adecuados para detectar los biomarcadores descritos. Los ejemplos de inmunoensayos son los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de precipitación radioinmune (RIPA), ensayos de captura de inmunobead, Western Blot, transferencia de puntos, ensayos de desplazamiento de gel, citometría de flujo, matrices de proteínas, matrices de cuentas multiplexadas, magnéticas captura, imágenes in vivo, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y recuperación/localización de fluorescencia después del foto-blanqueo (FRAP/FLAP).

55

En general, los agentes candidatos pueden identificarse a partir de grandes bibliotecas de productos naturales o extractos sintéticos (o semisintéticos) o bibliotecas químicas según los procedimientos conocidos en la técnica. Los expertos en el campo del descubrimiento y desarrollo de fármacos comprenderán que la fuente precisa de los extractos o compuestos de prueba no es crítica para los procedimientos de detección usados.

60

Por consiguiente, se puede analizar prácticamente cualquier cantidad de extractos químicos o compuestos usando los procedimientos ejemplares descritos en esta invención. Los ejemplos de dichos extractos o compuestos incluyen,

entre otros, extractos de origen vegetal, fúngico, procariota o animal, caldos de fermentación y compuestos sintéticos, así como también la modificación de compuestos existentes. También se encuentran disponibles numerosos procedimientos para generar la síntesis aleatoria o dirigida (por ejemplo, semisíntesis o síntesis total) de cualquier cantidad de compuestos químicos, que incluyen, de modo no taxativo, compuestos a base de sacáridos, lípidos, péptidos y ácidos nucleicos. Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de proveedores de bibliotecas químicas que incluyen, entre otros, ChemBridge Corporation (16981 Via Tazon, Suite G, San Diego, CA, 92127, EE.UU., www.chembridge.com); ChemDiv (6605 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121, EE.UU.); Life Chemicals (1103 Orange Center Road, Orange, CT 06477); Maybridge (Trevillet, Tintagel, Cornwall PL34 0HW, Reino Unido)

Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles comercialmente de varias fuentes, incluyendo O2H, (Cambridge, Reino Unido), MerLion Pharmaceuticals Pte Ltd (Singapore Science Park II, Singapur 117528) y Galapagos NV (Generaal De Wittelaan L11 A3, B-2800 Mechelen, Bélgica).

Además, las bibliotecas producidas de forma natural y sintética se producen, si así se lo desea, según procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procedimientos estándares de extracción y fraccionamiento o mediante procedimientos sintéticos estándares en combinación con síntesis orgánica en fase sólida, síntesis de microondas y otros procedimientos de rendimiento rápido conocidos en la técnica que pueden abordarse para hacer grandes cantidades de compuestos para fines de selección. Además, si así se lo desea, cualquier biblioteca o compuesto, incluido el formato de muestra y la disolución, se modifica y ajusta fácilmente usando procedimientos químicos, físicos o bioquímicos estándares. Además, los expertos en el arte del descubrimiento y desarrollo de fármacos comprenderán fácilmente que los procedimientos para la desreplicación (por ejemplo, desreplicación taxonómica, desreplicación biológica y desreplicación química, o cualquier combinación de las mismas) o la eliminación de réplicas o repeticiones de materiales ya conocidos por su efecto sobre MDS debe emplearse siempre que sea posible.

Los agentes candidatos abarcan numerosas clases químicas, pero, a menudo, son moléculas orgánicas, por ejemplo, compuestos orgánicos pequeños que presentan un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2500 Daltons. Los agentes candidatos pueden incluir grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, por ejemplo, al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo contienen carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores.

En algunos ejemplos, los agentes candidatos son proteínas. En algunos aspectos, los agentes candidatos son proteínas naturales o fragmentos de proteínas naturales. Por consiguiente, por ejemplo, se pueden usar extractos celulares que contienen proteínas, o digestos aleatorios o dirigidos de extractos celulares proteicos. De esta manera, se pueden hacer bibliotecas de proteínas procarióticas y eucarióticas para la detección, usando los procedimientos de la presente memoria. Las bibliotecas pueden ser proteínas bacterianas, fúngicas, virales y de vertebrados, así como también proteínas humanas.

Definiciones

El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos naturales o sintéticos que se unen selectivamente a un antígeno diana. El término incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas, también se incluyen en el término "anticuerpos" fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina, y versiones humanas o humanizadas de moléculas de inmunoglobulina que se unen selectivamente al antígeno diana.

Una "molécula quimérica" es una molécula única creada al unir dos o más moléculas que existen por separado en su estado nativo. La molécula quimérica individual presenta la funcionalidad deseada de todas sus moléculas constituyentes.

Una "proteína de fusión" se refiere a un polipéptido formado por la unión de dos o más polipéptidos a través de un enlace peptídico formado entre el extremo amino de un polipéptido y el extremo carboxilo de otro polipéptido. La proteína de fusión se puede formar mediante el acoplamiento químico de los polipéptidos constituyentes o se puede expresar como un polipéptido único a partir de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión contigua única. Una proteína de fusión monocatenaria es una proteína de fusión que presenta un esqueleto de polipéptido contiguo único. Las proteínas de fusión se pueden preparar usando técnicas convencionales en biología molecular para unir los dos genes en el marco en un solo ácido nucleico y, a continuación, expresar el ácido nucleico en una célula huésped adecuada en condiciones en las que se produce la proteína de fusión.

El término "inhibir" se refiere a una disminución en una actividad, respuesta, afección, enfermedad u otro parámetro

biológico. Esto puede incluir, entre otros, la ablación completa de la actividad, respuesta, afección o enfermedad. Esto también puede incluir, por ejemplo, una reducción del 10% en la actividad, respuesta, afección o enfermedad en comparación con el nivel nativo o de control. Por consiguiente, la reducción puede ser del 10, el 20, el 30, el 40, el 50, el 60, el 70, el 80, el 90 o el 100% o cualquier cantidad de reducción entre estas cifras, en comparación con niveles naturales o de control.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para administrar un fármaco (como los antagonistas descritos en esta invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen generalmente en formación de doble capa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

Los términos "péptido", "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente para referirse a una molécula natural o sintética que comprende dos o más aminoácidos unidos por el grupo carboxilo de un aminoácido al grupo alfa amino de otro.

El término "porcentaje (%) de identidad de secuencia" u "homología" se define como el porcentaje de nucleótidos o aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos o aminoácidos en una secuencia de ácido nucleico de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia puede lograrse de varias maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Mediante procedimientos conocidos se pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluyendo los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, según el criterio médico sensato, son adecuados para su uso en contacto con tejidos humanos y animales sin provocar una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones, de manera correspondiente a una proporción beneficio/riesgo razonable.

El término "se une específicamente", como se usa en esta invención, cuando se refiere a un polipéptido (incluidos anticuerpos) o receptor, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína o polipéptido o receptor en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por consiguiente, bajo condiciones designadas (por ejemplo, condiciones de inmunoensayo en el caso de un anticuerpo), un ligando o anticuerpo específico "se une específicamente" a su "diana" particular (por ejemplo, un anticuerpo se une específicamente a un antígeno endotelial) cuando no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra o a otras proteínas con las que el ligando o anticuerpo pueden entrar en contacto en un organismo. Generalmente, una primera molécula que "se une específicamente" a una segunda molécula presenta una constante de afinidad (K_a) mayor que aproximadamente 10^5 M^{-1} (por ejemplo, 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , and 10^{12} M^{-1} o más) con esa segunda molécula.

El término "sujeto" se refiere a cualquier individuo que es el objetivo de la administración o el tratamiento. El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Por consiguiente, el sujeto puede ser un paciente humano o veterinario. El término "paciente" se refiere a un sujeto bajo el tratamiento de un clínico, por ejemplo, un médico.

El término "terapéuticamente efectivo" se refiere a la cantidad de la composición usada que es de cantidad suficiente para mejorar una o más provocas o síntomas de una enfermedad o trastorno. Dicha mejora solo requiere una reducción o alteración, no necesariamente una eliminación.

El término "tratamiento" se refiere a la atención médica de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o evitar una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, tratamiento dirigido específicamente a la mejora de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, tratamiento dirigido a retirar la provoca de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas en vez de la cura de la enfermedad, afección patológica o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida a la mejora de la enfermedad, afección patológica o trastorno asociados.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Mielodisplasia inducida por microentorno mediada por células supresoras derivadas de mieloides.

Procedimientos

Pacientes con MDS. La mayoría de los pacientes con MDS presentaban bajo riesgo, a menos que se especifique lo contrario. Todos los pacientes fueron confirmados por una revisión central y clasificados según los criterios de la Organización Mundial de la Salud o el Sistema Internacional de Puntuación de Pronóstico (IPSS). Los pacientes fueron reclutados de la clínica de hematología maligna en el Centro Lee Moffitt para el Cáncer e Instituto de Investigación y el Centro Médico Nijmegen de la Universidad Radboud, Departamento de Hematología en los Países Bajos. Las células mononucleares de la médula ósea (MNC-MO) se aislaron de aspirados de MO heparinizados mediante centrifugación en gradiente Ficoll-Hypaque, como se describió anteriormente (Wei, S. y col. 2009 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 106:12974-12979). Las MDSC se definieron y purificaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de células CD33⁺ que carecen de la expresión de marcadores de linaje (Lin⁻; CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) y HLA-DR.

Ratones. Todo el trabajo con ratones fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad del Sur de Florida. Se compraron ratones FVB/NJ de tipo salvaje (TS) de Jackson Laboratories, y se generaron y eliminaron ratones transgénicos S100A9 (KO) y ratones transgénicos S100A9 (Tg) como se describió anteriormente (Cheng, P. y col. 2008 J Exp Med 205:2235-2249; Manitz, M.P., y col. 2003. Mol Cell Biol 23:1034-1043). Los ratones S100A9Tg se generaron a partir de ratones homocigotos FVB/NJ y se criaron durante más de 15 generaciones. Para el experimento de trasplante competitivo, se irradiaron ratones hembra tipo FVB/NJ de 18 semanas de edad, una vez, en un irradiador gamma rotatorio, para una dosis total de 900Gy. Al mismo tiempo, las células de la MO se aislaron de las tibias y fémures de ratones TS o S100A9Tg machos de la misma edad a partir de los cuales las HSC se enriquecieron mediante clasificación de células magnéticas (MACS, Millitenyi Biotech) siguiendo el protocolo del fabricante. Seis horas después de la irradiación 1×10^7 células HSC enriquecidas se administraron mediante inyección en la vena de la cola en ratones receptores. Los ratones fueron monitoreados cada dos días, con mediciones de peso bajo una campana estéril. Semanalmente, el personal de Vivarium, en el centro, recolectó sangre periférica de la vena antero-orbital para el hemograma completo. A las 8 semanas (después de lo cual se injertaron los receptores TS, GB $> 3 \times 10^3$ células/ml de sangre), los ratones se sometieron a una eutanasia mediante aspiración de CO₂, punto en el que se recogió sangre periférica mediante punción cardíaca, lo cual fue seguido de la disección de las tibias y los fémures (como antes), así como también el bazo para su evaluación.

Hibridación fluorescente in situ (FISH). El procedimiento FISH se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Centro de Cáncer Moffitt, y los procedimientos detallados se han descrito anteriormente (Wei, S. y col. 2009 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 106:12974-12979). El ADN diana de las células MDSC positivas (MDSC del MDS) y las MDSC negativas se purificó de los mismos pacientes en los que anteriormente se había confirmado que presentaban del5q o del7q mediante el uso de una prueba disponible comercialmente (laboratorio Abbott).

Inmunotinción. Las MNC de la MO se purificaron de pacientes con MDS, diluidos a una concentración de 3×10^5 células/ml, citopinzado en portaobjetos de microscopio y fijado con metanol/acetona (proporción de 3:1 a -20°C durante 30 min). Los lavados se efectuaron con tampón triton X-100 durante 5 minutos y tampón Tris 50 mM (pH 7,4) durante 10 minutos, antes del bloqueo para la unión no específica con suero. Las diapositivas se tiñeron con los anticuerpos primarios: anticuerpo anti-CD33 de conejo (dilución de 1:100, Santa Cruz), anti-granzima B de ratón (dilución de 1:100, Fitzgerald Industries) y CD71 anti-humano de ratón (dilución de 1:100, BD Biosciences) seguido de sus respectivos anticuerpos secundarios, IgG anti-conejo de cabra AlexaFluor-594 (Invitrogen), anti-ratón de cabra FITC (Sigma) e IgG anti-ratón de cabra Alexa-350 (Molecular Probes). La glucóforina A antihumana de rata se preconjugó a Alexa-647 usando un kit de Molecular Probes) antes de la adición a la muestra (dilución 1:50, AbD Serotec), lo cual fue seguido por el montaje de los portaobjetos con un medio acuoso (Molecular Probes, EE.UU.). La inmunofluorescencia se detectó usando un microscopio de fluorescencia vertical automatizado Zeiss e imágenes capturadas por una cámara Nikon con el programa de captura AxioVision. Anteriormente, se habían publicado procedimientos detallados para la inmunotinción en células SJCRH30 transfectadas con S100A9 (Chen, X., y col. 2008. Blood 113(14):3226-34). Específicamente, las células SJCRH30, que carecen de niveles de expresión detectables tanto de CD33 como de S100A9, se transfectaron con S100A9 o S100A8 (control negativo) durante 48 a 72 horas. Después de la incubación con fusión de CD33 durante 30 minutos (2 µg/ml), 1×10^4 células se citopinzaron sobre portaobjetos y, a continuación, se tiñeron con un IgG1-APC anti-humano secundario antes del análisis por microscopía de inmunofluorescencia. De manera similar, las células SJCRH30, transfectadas de forma estable con CD33, se incubaron con rhS100A9 marcado con DDK durante varios puntos de tiempo y se tiñeron con la misma metodología antes del análisis.

Ensayos de supresión. Para determinar si las MDSC son capaces de mediar la supresión de células T, se clasificaron células CD45⁺CD33⁺CD11b⁺Lin⁻ de la médula ósea completa de pacientes con MDS mediante FACS. Se usaron los siguientes anticuerpos: CD45-PECy7, CD33-PECy5, CD11b-FITC, CD3-PE, CD14-PE, CD20-PE (todos Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.), CD16-PE, CD19-PE (DAKO, Glostrup, Dinamarca) y CD56-PE (BD Biosciences, San

- Diego, CA, EE.UU.). Las células T se aislaron mediante clasificación de células activadas magnéticamente (MACS) usando microesferas CD3 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, EE.UU.) De sangre periférica autóloga. Se sembraron 20.000 células T en una placa de fondo redondo de 96 pocillos por triplicado, en un medio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM; Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con un 10% de suero humano PAA (Laboratorios PAA, Pasching, Austria). Los cultivos se estimularon con 30 U/ml de IL-2 (Chiron, Emeryville, CA, EE.UU.) y esferas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), en una proporción de 1:2 de células T a esferas. Las MDSC se mezclaron con cultivos de células T en proporciones de 1:2 y 1:4 y se complementaron con 10 ng/ml de GM-CSF para respaldar la viabilidad de las MDSC. Después de 3 días de cocultivo, se recogieron los sobrenadantes de cultivo para medir la concentración de IFN- γ mediante ELISA (Pierce Endogen, Rockford, IL, EE.UU.). Posteriormente, se añadieron 0,5 μ Ci³ deH-timidina (Perkin Elmer, Groningen, Países Bajos) a cada pocillo y, después de la incubación durante la noche, se midió la incorporación de ³H-timidina usando un contador 1205 Wallac Betaplate (PerkinElmer). Para determinar si las diferencias en la proliferación y la producción de IFN- γ fueron estadísticamente significativas, se usó la prueba post-hoc Anova con Bonferroni de una vía. La significancia estadística fue aceptada para valores de $p < 0,05$.
- Ensayo de formación de colonias.** Las células aisladas de la MO humana o de las tibias y fémures de S100A9Tg, S100A9KO o TS se sometieron a ACK durante 5 minutos a temperatura ambiente (Sigma) a fin de lisar los glóbulos rojos. Las células de la MO restantes se sembraron en medios de metilcelulosa completos (medio completo MethoCult con las citocinas y factores de crecimiento necesarios (Tecnologías StemCell) y la mezcla se colocó en placas de cultivo de 35 mm cuadradas por duplicado (2×10^5 células/placa) y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 7 a 14 días. Después de la incubación, las colonias de las UFB-E y UFC-GM se identificaron manualmente y se contaron usando un microscopio óptico invertido. Para los ensayos de formación de colonias efectuados con ratones tratados con ATRA, administramos ATRA a 250 μ g (200 μ l) o el vehículo (aceite de oliva) por vía oral durante cinco días consecutivos, antes de descansar dos días.
- Expresión de ARNm en tiempo real con cuantificación.** Las reacciones de la RT-PCR y la RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) se efectuaron mediante iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). La mezcla de reacción (25 μ l en total) contenía 12,5 μ l de supermezcla verde iQ SYBR, 0,25 μ l de cebador directo (s GAPDH) (20 μ M), 11 μ l de agua libre de ARNasa y 1,0 μ l de ADNc. Se efectuaron los siguientes ciclos: 1 x 3 min a 95°C, 40 ciclos de amplificación (15 s 95°C, 60 s 56°C) 1 x 1 min 95°C; con cada ensayo, se ejecutó 1 x 1 control negativo sin plantilla de ADNc. El punto de fusión óptimo de ADNc l y min 55°C y una curva de fusión (80 x 10 s 55°C con un aumento de 0,5°C por 10 segundos). La eficiencia de la reacción se optimizó de antemano. El número de copias de la transcripción por individuo se calculó mediante la normalización a la expresión de GAPDH. El nivel relativo de expresión génica para cada paciente se calculó mediante normalización al nivel de expresión promedio observado en cinco controles. Las células SJCRH 30 transfectadas y no transfectadas con CD33 se trataron con 1 μ g de rhS100A9 durante 20 minutos y la expresión se midió por Q-PCR para detectar la presencia de IL10 y TGF β a partir del ARN total y se calculó mediante el procedimiento $\Delta\Delta C_t$ donde las células no tratadas con rhS100A9 fueron el control experimental y el gen de mantenimiento GAPDH fue el control interno. Las barras de error representan el EEM de tres experimentos separados.
- Preparación de la proteína de fusión quimérica CD33/Siglec 3.** La fusión soluble recombinante del ectodominio de CD33/Siglec 3 se construyó como se describió anteriormente (Cannon, J.P. y col. 2012 Immunogenetics 64:39-47; Cannon, J.P., y col. 2011. Methods Mol Biol 748:51-67; Cannon, J.P., y col. 2008. Immunity 29:228-237). Específicamente, los fragmentos de ADNc que codifican el ectodominio de CD33/Siglec 3 se amplificaron por PCR y se insertaron en un vector que codifica el Fcy humano seguido de un sitio de reconocimiento de extremo C para la ligasa de biotina de E. coli. Este vector ha sido diseñado para facilitar la fusión de segmentos de genes que codifican dominios extracelulares de tipo Ig a la región Fc de la IgG1 humana. Las proteínas recombinantes se expresaron en células 293T después de la transfección, usando Lipofectamine (Invitrogen), con tres cosechas sucesivas de 25 ml de medio libre de suero OPTI-MEM I. Las cosechas se agruparon, se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos para eliminar los desechos y se almacenaron a 4°C en azida sódica al 0,02%. Las concentraciones de fusiones de CD33 en sobrenadantes de cultivo se determinaron mediante el ensayo de Bradford (Biorad, Carlsbad, CA).
- Espectrometría de masas.** Después de la digestión trípica en gel, los péptidos se extrajeron y se concentraron bajo centrifugación al vacío. Se usó un cromatógrafo de líquidos de nanoflujo (Easy-nLC, Proxeon, Odense, Dinamarca) acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones de electroaspiración (LTQ, Thermo, San José, CA) para experimentos de secuenciación de péptidos de espectrometría de masas en tándem. La muestra se cargó primero en una columna trampa (resina BioSphere C18 de fase inversa, 5 μ m, 120 Å, 100 μ m ID, NanoSeparations, Nieuwkoop, Países Bajos) y se lavó durante 3 minutos a 8 ml/minuto. Los péptidos atrapados se eluyeron sobre la columna analítica (resina de fase inversa BioSphere C18, 150 mm, 5 μ m, 120 Å, 100 μ m ID, NanoSeparations, Nieuwkoop, Países Bajos). Los péptidos se eluyeron en un gradiente de 60 minutos de 5% a 45% B (disolvente A: 2% de acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico; solvente B: 90% de acetonitrilo + 0,1% de ácido fórmico) con un caudal de 300 nl/min. Se recolectaron cinco espectros de masas en tándem de manera dependiente de los datos después de cada exploración. Las secuencias se asignaron mediante búsquedas de Mascot (www.matrixscience.com) contra entradas

IPI humanas. La carbamidometilación de cisteína, la oxidación de metionina y la desamidación de asparagina y glutamina se seleccionaron como modificaciones variables, y se permitieron hasta 2 clivajes tripticos perdidos. La tolerancia de masa del precursor se establece en 2,5 y la tolerancia de iones fragmentados en 0,8. Los resultados de Mascot se compilaron en Scaffold, que se usó para la inspección manual de las asignaciones de péptidos y las 5 identificaciones de proteínas.

Identificaciones de la unión específica de S100A9 a CD33/Siglec 3. Ensayo ELISA para el lisado celular de unión a fusión de CD33 de células SJCRH 30 transfectadas con S100A9. Se recubrieron placas ELISA de fondo plano de noventa y seis pocillos durante la noche con 1 ug/ml de anti-S100A9 monoclonal, según las sugerencias del fabricante.

10 Después de lavar con 1 X PBS-T, se adicionaron a los pocillos 50 µl de lisados de células no transfectadas (negativas) o células transfectadas con S100A9. El anticuerpo secundario era un anticuerpo policlonal S100A9 (control positivo) o fusión de CD33 como se indicó, lo cual fue seguido por el análisis de reacción ELISA HRP a 440 nm.

Preparación del vector adenoviral que expresa CD33. El plásmido CD33 (GeneCopeia) se subclonó en un vector 15 pShuttle-IRES-hrGFP-1 (que contiene el promotor de CMV y hrGFP). Los vectores transportadores digeridos con PmeI se cotransformaron, a continuación, en bacterias BJ5183 electrocompetentes con pAdEasy-1 (que contiene el esqueleto viral) y se seleccionaron en placas Kanamycin LB. El plásmido en la bacteria se amplificó y purificó usando un sistema de plásmido maxiprep (Qiagen). El vector adenoviral completo se linealizó por digestión con PacI y, a continuación, se transfectó en células AD293 usando Lipofectamine (Invitrogen). Todos los adenovirus recombinantes 20 se amplificaron en células AD293. Se obtuvieron reservas virales mediante amplificación de las células AD293 seguido de ultracentrifugación con gradiente de CsCl estándar de dos etapas, la diálisis y el almacenamiento en una reserva de glicerol (10% volumen/volumen) a -80°C. El título de cada reserva viral se probó rutinariamente para verificar que sea de 10^{11} - 10^{12} pfu por ensayo de formación de placas usando células AD293.

25 *Preparación de vectores lentivirales de ARNhc.* El plásmido de ARNhc SureSilencing™ para S100A8, S100A9 y CD33 humanos y el control negativo (no diana) se adquirieron de SABiosciences. Las células 293T se transfectaron usando reactivo de transfección (SABiosciences), según las instrucciones del fabricante. Después de 6 horas de incubación, el reactivo de transfección se retiró y se reemplazó con DMEM fresco suplementado con suero bovino fetal al 10%. El medio que contiene el virus se recogió 24-48 h después. Los plásmidos, DAP12 de tipo salvaje pcDNA3 y P23-DAP12, 30 se cortaron con HindIII y XhoI (Promega), y se usó DNA Polymerase I Large (KlenowI) (New England Biolabs Inc.) para rellenar los extremos 3' huecos de los fragmentos de ADN. El pWPI, que contiene un casete de expresión de GFP (Organización Addgene), se digirió usando PmeI (New England Biolabs Inc.). Después de cortar el ADN y el vector, los pWPI se purificaron con el kit de purificación por PCR Strata Prep (Qiagen), los ADN se ligaron (kit de ligadura de ADN Takara, Fisher) en el vector pWPI y las células competentes STBL2 se transformaron (Invitrogen). 35 Las células 293T se transfectaron con el vector de lentivirus pWPI, el plásmido de empaquetamiento, psPAX2 y el plásmido envolvente, pMD2.G (Addgene Organization) usando Lipofectemine-2000 (Invitrogen) en una proporción de 4:3:1, según los protocolos estándares. Después de 6 horas de incubación, el reactivo de transfección se retiró y se reemplazó con DMEM fresco suplementado con suero bovino fetal al 10%. El medio que contiene el virus se recogió 24-48 h después. La infección celular se realizó como se describió anteriormente. Cuatro días después de la primera 40 infección, las células transducidas se aislaron mediante clasificación de FACS de células GFP⁺ con > un 99% de pureza.

Infección de MDSC de pacientes con MDS. Las MDSC aisladas de pacientes con MDS se infectaron tres veces usando un medio de infección que contiene virus a intervalos de 24 horas, en presencia de 8 µg/ml de polibereño. Para cada 45 infección, las células se sembraron en placas de 12 pocillos a 1×10^6 células/pocillo. Cuatro días después de la primera infección, las células se recolectaron y se usaron para una PCR en tiempo real, un análisis Western blot, una citometría de flujo o ensayos de formación de colonias.

Citometría de flujo. Las MNC-MO se tiñeron con anticuerpos conjugados específicos adecuados en PBS con un 50 tampón BSA al 2%. Para la clasificación de las MDSC, se usaron anti-CD3 FITC y anti-HLA-DR FITC como controles positivos y el isotipo IgG se usó para el control negativo y para detectar la tinción inespecífica. Las células se mezclaron suavemente y se incubaron durante 30 minutos a 4°C, en la oscuridad. Las muestras se lavaron con PBS y se centrifugaron a 500 g durante 5 min. Para las células usadas únicamente en el análisis fenotípico, se adicionaron 0,5 ml de paraformaldehído al 1% en PBS antes del análisis.

55 Las células se lavaron en PBS y, a continuación, se tiñeron con mAb conjugados con PE específicos para CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7, CD11c, CD14, HLA-DR, TLR2 o TLR4 y controles de isotipo relevantes (eBioscience) durante 30 minutos, en la oscuridad y sobre hielo. A continuación, se lavaron las células con PBS que contenía 0,5% de BSA. Las células vivas se cerraron en base a la tinción negativa para 7-AAD. Las muestras se adquirieron en un 60 citómetro de flujo FACSCalibur y el análisis se realizó con el software Flowjo 6.3.4.

Actividad de arginasa. La actividad de arginasa se midió en lisados celulares como se describió anteriormente (Youn,

J.I. y col. 2008 J Immunol 181:5791-5802). En resumen, las células se lisaron durante 30 minutos con 100 µl de Triton X-100 al 0,1%. Posteriormente, se adicionaron 100 µl de Tris-HCl 25 mM y 10 µl de 10 mM MnCl₂, y la enzima se activó calentando durante 10 minutos a 56°C. La hidrólisis de arginina se realizó incubando el lisado con 100 µl de L-arginina 0,5 M (pH 9,7) a 37°C durante 120 min. La reacción se detuvo con 900 µl de H₂SO₄ (96%)/H₃PO₄ (85%)/H₂O (1/3/7, v/v/v). La concentración de urea se midió a 540 nm después de la adición de 40 µl de α-isonitrosopropiofenona (disuelta en etanol al 100%), lo cual fue seguido por un calentamiento a 95°C durante 30 min.

SIN producción. Se mezclaron volúmenes iguales de sobrenadantes de cultivo (100 µl) con una solución de reactivo de Greiss (sulfanilamida al 1% en ácido fosfórico al 5% y diclorhidrato de N-1-naftiletilendiamina al 0,1%) en agua doblemente destilada y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de la mezcla se midió a 550 nm usando un lector de placa de microplacas (Bio-Rad). Las concentraciones de nitrito se determinaron comparando los valores de absorbancia para las muestras de prueba con una curva estándar generada por dilución en serie de 0,25 mM de nitrito de sodio.

15 *Análisis de Western Blot.* Los lisados celulares se prepararon resuspendiendo el sedimento celular en NP-40 al 1%, 10 mM de Tris, 140 mM de NaCl, 0,1 mM de PMSF, 10 mM de yodoacetamida, 50 mM de NaF, 1 mM de EDTA, 0,4 mM de ortovanadato sódico, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de pepstatina, y 10 µg/ml de aprotinina y procediendo al lisado en hielo durante 30 minutos. Los lisados celulares se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos para eliminar núcleos y restos celulares. La concentración de proteína de los extractos solubles se determinó usando el
20 ensayo de proteína Bio-Rad (Bradford). Se separaron 50 µg de proteína (por banda) en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% por electroforesis y, a continuación, se transfirieron a una membrana de PVDF. Se probaron las membranas para el anticuerpo indicado: anti-S100A8 o anti-S100A9 (MRP8 o calgranulina A y anti-MRP14 o calgranulina B respectivamente, Santa Cruz); anti-S100A8/A9 (Santa Cruz); anti-fosfo Erk, anti-total Erk, anti-fosfo Syk y anti-total Syk (señalización celular). Las proteínas se detectaron con el sistema mejorado de detección de quimioluminiscencia
25 (ECL, Amersham). El lisado de S100A9 sin transfectar, vector vacío células SJCRH30 o AD293 transfectadas con S100A9 se diluyó en serie (como se indica en la figura) con el primer lisado, comenzando a 50 µg, seguido de la carga en una membrana de nitrocelulosa y el bloqueo durante la noche a 4°C en un 5% de leche. Después de la incubación con fusión de CD33 durante 2 horas a temperatura ambiente, y la tinción con un secundario conjugado con IgG anti-HRP humano, la membrana se lavó y se usó para el análisis radiográfico destinado a demostrar la unión específica
30 de S100A9 a CD33. Más tarde, la membrana se usó para la tinción con azul de Coomassie para mostrar la carga relativa igual de proteínas en cada punto en la membrana de nitrocelulosa.

Hemograma completo de sangre periférica. El hemograma completo fue efectuado por personal patológico de laboratorio de animales en el vivero del Centro de Cáncer Moffitt. Los parámetros de sangre del ratón se determinaron
35 como se describe en la Tabla 1, con un Analizador de hematología Heska Hematruer.

Examen patológico de bazo y biopsia de la MO de ratones TS y S100A9Tg. Se obtuvieron células de médula ósea de tibias bilaterales y fémures de ratones S100A9Tg y TS de 6 meses de edad, como se describió anteriormente (Xu, S. y col. 2010 J Biomed Biotechnol 2010:105940). Se prepararon impresiones táctiles de esplenocitos murinos como se describió (Ioachim, H.L. y col. 2008 Ioachim's lymph node pathology. Chapter 3. cytopathology. Wolters
40 Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. :p 21-22). Los aspirados de médula ósea y las huellas táctiles se tiñeron usando la tinción Wright-Giemsa. Las secciones de médula ósea y bazo se fijaron en formalina neutra tamponada con fosfato al 10%, se descalcificaron (solo se aplicaron a la médula ósea) y se embebieron en parafina mediante los procedimientos de rutina. Las secciones se cortaron a 4 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y con ácido
45 periódico Schiff (PAS). La presencia de características mielodisplásicas características del MDS fue evaluada por un hematopatólogo experimentado. La biopsia central de la MO muestra un 50% de celularidad con hematopoyesis trilineal madura (H&E, 200x). La Figura 5E muestra una vista de alta potencia de la biopsia de la MO que muestra megacariocitos de apariencia normal con lobulación normal. Los precursores mixtos mieloides y eritroides se distribuyen normalmente con una proporción M:E estimada de 2:1 (H&E, 600x). El aspirado de la MO teñido con
50 Wright-Giemsa exhibe maduración completa en los tres linajes sin características displásicas (Wright-Giemsa, 1000x). La entrada muestra un megacariocito lobulado normal (Figura 5F). La impresión táctil del bazo del ratón muestra el predominio de linfocitos pequeños y maduros entremezclados con precursores eritropoyéticos ocasionales (Wright-Giemsa, 1000 x) (Figura 5G). La biopsia central de la MO revela hiper celularidad, aproximadamente un 95% con megacariocitos aumentados, especialmente en formas pequeñas (H&E, 200x) (Figura 5H). El aumento de alta
55 potencia resalta los megacariocitos displásicos con núcleos únicos o hipolobados o desarticulados y notablemente aumentados en número (H&E, 600x) (inserto) (Figura 5I). La entrada incluye dos micromegacariocitos marcadamente displásicos con hipoglocación. Los aspirados de la MO exhiben explosiones levemente aumentadas mezcladas con precursores mieloides y eritroides. Este último muestra un contorno nuclear ligeramente irregular y cambios megaloblastoides mínimos (Wright-Giemsa, 1000x) (Figura 5J). La entrada contiene dos explosiones que muestran
60 cromatina fina o delicada, nucléolos prominentes, alta proporción N:C y escaso citoplasma basofílico. La preparación táctil del bazo transgénico de ratón muestra un aumento de los precursores eritroides; algunos de ellos muestran un tamaño ampliado con una nuclearidad anormal y un puente nuclear ocasional (Wright-Giemsa, 1000x) (Figura 5K).

Estadísticas. Todos los datos se presentaron como medias $\pm$ EEM. Los cálculos estadísticos se efectuaron con las herramientas de análisis Microsoft Excel o GraphPad Prism. Las diferencias entre los grupos individuales se analizaron mediante la prueba t emparejada. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

5

Resultados

Las MDSC Lin⁺HLA-DR⁺CD33⁺ se expanden en especímenes primarios de la MO con MDS y la supresión directa de precursores eritroides autólogos. Las células mononucleares de la médula ósea (MNC-MO) se aislaron de los aspirados de la MO con MDS ($n = 12$), de la MO saludable de la misma edad ($n = 8$) o de pacientes con cáncer no MDS (4 de seno y 4 de linfoma) y se analizaron para detectar la presencia de MDSC Lin⁺HLA-DR⁺CD33⁺ mediante citometría de flujo. Los pacientes con MDS exhibieron números marcadamente más altos de MDSC (promedio del 35,5%, $P < 0,0001$), en comparación con donantes sanos o pacientes con cáncer no MDS (menos del 5%, Figura 1A). Para determinar si las MDSC con MDS se derivan del clon del MDS maligno, las MDSC Lin⁺HLA-DR⁺CD33⁺ se clasificaron a partir de especímenes del MDS con delección del cromosoma 5q [del(5q)] o 7q [del(7q)] y se analizaron mediante hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) con sondas específicas.

Las células citogenéticamente anormales que albergan del(5q) o del(7q) se restringieron a la población no MDSC, mientras que las MDSC Lin⁺HLA-DR⁺CD33⁺ mostraron un complemento cromosómico normal correspondiente (Figura 1B). Los estudios de secuenciación de exomas han demostrado que las mutaciones de genes somáticos clonales son demostrables en la gran mayoría de los especímenes de MDS que carecen de anomalías cromosómicas por cariotipo de metafase. Para evaluar adicionalmente la relación entre las MDSC y el clon del MDS, se realizó una matriz QPCR de las mutaciones genéticas más comunes en el MDS (Qiagen) en poblaciones de MDSC purificadas y poblaciones no MDSC de especímenes primarios del MDS de médula ósea. Se detectaron mutaciones que involucran los genes CBL, EZH2, IDH1/2, N-RAS, SRSF2, U2A535 y RUNX1 en los especímenes de MDS, sin embargo, todas las mutaciones se restringieron a la fracción desprovista de MDSC (Tabla 1), lo que indica que las MDSC Lin⁺HLA-DR⁺CD33⁺ son distintas del clon maligno.

Tabla 1: Síndromes mielodisplásicos humanos de la matriz de PCR de mutación somática con qBiomarker™ ($n = 6$)

Gen	IDENTIFICACIÓN CÓSMICA	cambio de nt	cambio AA	NO MDSC						MDSC N=6
				Pt 1	Pt 2	Pt 3	Pt 4	Pt 5	Pt 6	
ASXL1	36166	c.1772_1773insA	p.Y591fs*1	-	-	-	-	-	-	-
ASXL1	41716	c.1888_1909de122	p.H630fs*66	-	-	-	-	-	-	-
ASXL1	41717	c.2302C>T	p.Q768*	-	-	-	-	-	-	-
ASXL1	52930	c.2324T>G	p.L775*	-	-	-	-	-	-	-
ASXL1	41715	c.3202C>T	p.R1068*	-	-	-	-	-	-	-
CBL	34052	c.1111T>C	p.Y371H	-	-	-	-	-	-	-
CBL	34055	c.1139T>C	p.L380P	-	+	+	+	+	+	-
CBL	34057	c.1150T>C	p.C384R	-	+	+	+	-	+	-
CBL	34077	c.1259G>A	p.R420Q	-	-	-	-	+	-	-
DNMT3A	53042	c.2644C>T	p.R882C	-	-	-	-	-	-	-
DNMT3A	87007	c.2711C>T	p.P904L	-	-	-	-	-	-	-
EZH2	37031	c.1936T>A	p.Y646N	-	+	+	+	-	+	-
EZH2	37029	c.1937A>C	p.Y646S	-	+	+	+	-	+	-
EZH2	37028	c.1937A>T	p.Y646F	-	+	+	+	+	+	-
IDH1	28748	c.394C>A	p.R132S	-	-	-	-	-	-	-
IDH1	28749	c.394C>G	p.R132G	-	+	+	+	+	+	-
IDH1	28747	c.394C>T	p.R132C	-	+	-	-	+	+	-
IDH1	28746	c.395G>A	p.R132H	-	+	+	+	-	-	-

Tabla 1: Síndromes mielodisplásicos humanos de la matriz de PCR de mutación somática con qBiomarker™ (n = 6)

Gen	IDENTIFICACIÓN CÓSMICA	cambio de nt	cambio AA	NO MDSC						MDSC N=6
				Pt 1	Pt 2	Pt 3	Pt 4	Pt 5	Pt 6	
IDH1	28750	c.395G>T	p.R132L	-	+	+	+	+	+	-
IDH2	41877	c.418C>T	p.R140W	-	+	+	+	-	-	-
IDH2	41590	c.419G>A	p.R140Q	+	-	-	-	+	+	-
IDH2	41875	c.419G>T	p.R140L	-	+	+	+	+	+	-
IDH2	34039	c.514A>T	p.R172W	+	+	+	+	+	+	-
IDH2	33733	c.515G>A	p.R172K	-	+	+	+	+	+	-
IDH2	33732	c.515G>T	p.R172M	-	+	+	+	-	+	-
IDH2	34090	c.516G>T	p.R172S	-	-	+	-	-	-	-
NRAS	580	c.181C>A	p.Q61K	-	+	+	+	+	+	-
NRAS	584	c.182A>G	p.Q61R	-	+	+	+	-	+	-
NRAS	583	c.182A>T	p.Q61L	-	-	-	-	-	-	-
NRAS	586	c.183A>C	p.Q61H	-	+	+	+	+	+	-
NRAS	585	c.183A>T	p.Q61H	-	-	-	-	+	-	-
NRAS	563	c.34G>A	p.G12S	-	+	-	-	-	+	-
NRAS	562	c.34G>T	p.G12C	-	+	+	+	+	-	-
NRAS	564	c.35G>A	p.G12D	-	-	+	-	+	+	-
NRAS	565	c.35G>C	p.G12A	-	+	-	+	+	+	-
NRAS	566	c.35G>T	p.G12V	-	+	+	+	+	+	-
NRAS	569	c.37G>C	p.G13R	-	+	+	+	+	+	-
NRAS	570	c.37G>T	p.G13C	-	+	+	+	+	+	-
NRAS	573	c.38G>A	p.G13D	-	-	-	-	-	-	-
NRAS	574	c.38G>T	p.G13V	-	+	-	+	+	+	-
RUNX1	24756	c.167T>C	p.L56S	-	+	+	-	-	+	-
RUNX1	24736	c.319C>T	p.R107C	-	+	+	+	-	+	-
RUNX1	24769	c.496C>T	p.R166*	-	-	-	-	-	-	-
RUNX1	24721	c.592G>A	p.D198N	-	-	-	-	-	-	-
RUNX1	24799	c.593A>G	p.D198G	-	-	-	-	+	-	-
RUNX1	24805	c.602G>A	p.R201Q	-	+	-	+	-	-	-
RUNX1	24731	c.611G>A	p.R204Q	-	-	-	+	+	-	-
SF3B1	110693	c.1866G>T	p.E622D	-	-	-	-	-	-	-
SF3B1	110695	c.1874G>T	p.R625L	-	-	-	-	-	-	-
SF3B1	131560	c.1984C>G	p.H662D	-	-	-	-	-	-	-
SF3B1	130416	c.1986C>A	p.H662Q	-	-	-	-	-	-	-
SF3B1	110692	c.1986C>G	p.H662Q	-	-	-	-	-	-	-
SF3B1	110694	c.1996A>G	p.K666E	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 1: Síndromes mielodisplásicos humanos de la matriz de PCR de mutación somática con qBiomarker™ (n = 6)

Gen	IDENTIFICACIÓN CÓSMICA	cambio de nt	cambio AA	NO MDSC						MDSC N=6
				Pt 1	Pt 2	Pt 3	Pt 4	Pt 5	Pt 6	
SRSF2	98000028	c.284C>A	P95H	-	+	+	+	+	+	-
SRSF2	98000029	c.284C>T	P95L	-	+	+	+	+	-	-
SRSF2	98000030	c.284C>G	P95R	-	+	+	+	+	+	-
TET2	41644	c.1648C>T	p.R550*	-	+	+	-	-	-	-
TET2	43417	c.2746C>T	p.Q916*	-	-	-	-	-	-	-
TP53	10648	c.524G>A	p.R175H	-	-	-	-	-	-	-
TP53	10662	c.743G>A	p.R248Q	-	+	+	+	-	-	-
TP53	10660	c.818G>A	p.R273H	-	-	-	-	+	-	-
TP53	10656	c.742C>T	p.R248W	-	-	-	-	-	-	-
TP53	10659	c.817C>T	p.R273C	-	-	-	-	+	-	-
TP53	10704	c.844C>T	p.R282W	-	-	-	-	-	-	-
TP53	10817	c.747G>T	p.R249S	-	+	+	+	+	+	-
TP53	6932	c.733G>A	p.G245S	-	-	-	-	+	-	-
TP53	10758	c.659A>G	p.Y220C	-	+	+	-	+	-	-
TP53	10654	c.637C>T	p.R213*	-	-	-	-	-	-	-
TP53	10670	c.469G>T	p.V157F	-	-	-	+	-	-	-
TP53	10705	c.586C>T	p.R196*	-	-	-	+	-	+	-
TP53	10645	c.527G>T	p.C176F	-	-	+	+	-	+	-
TP53	10889	c.536A>G	p.H179R	-	+	+	+	-	+	-
TP53	10808	c.488A>G	p.Y163C	-	+	+	+	-	-	-
TP53	10722	c.853G>A	p.E285K	-	+	-	-	-	+	-
TP53	43606	c.734G>A	p.G245D	-	+	+	+	+	-	-
TP53	10779	c.818G>T	p.R273L	-	+	+	+	+	+	-
TP53	10725	c.701A>G	p.Y234C	+	+	+	+	-	+	-
U2AF35	98000031	c.470A>C	Q157P	+	+	+	+	-	+	-
U2AF35	98000032	c.470A>G	Q157R	-	+	+	+	-	+	-
U2AF35	98000033	c.101C>T	S34F	-	-	-	-	-	-	-
U2AF35	98000034	c.101C>A	S34Y	+	+	+	+	-	+	-
DNMT3A	99000100	número_de_copia	número_de_copia	-	-	-	-	-	-	-

La muestra estaba fresca y se clasificó antes del aislamiento del ADN genómico. Según la descripción del análisis del fabricante: la CT sin procesar para un ensayo de mutación dado en una muestra de prueba se compara con un valor de corte de CT predefinido. Según la diferencia, la mutación se puede considerar como "Presente" (+), "Límite" (-/+) o "Ausente" (-).

Las propiedades funcionales reconocidas de las MDSC incluyen la supresión de la proliferación de células T estimulada por un antígeno o CD3 y la producción de interferón gamma (IFN-γ) (Gabrilovich, D.I., y col. 2009 Nat Rev

Immunol 9:162-174; Ostrand-Rosenberg, S., y col. 2009. J Immunol 182:4499-4506). Las células T purificadas de la MO de pacientes con MDS mostraron una proliferación de células T (Figura 1C) y producción de IFN- γ (Figura 1D) reducidas después del cocultivo con MDSC autólogas del MDS, lo que demuestra la actividad supresora esperada de estas células. Para validar adicionalmente estos hallazgos, las MDSC fueron desprovistas de los especímenes de la MO con MDS antes de la estimulación con anti-CD3/anti-CD28 y, a continuación, las MDSC se adicionaron nuevamente al grupo de control. La reducción de las MDSC mejoró significativamente las respuestas de las células T en comparación con el grupo complementado con las MDSC (Figura 1E), vinculando así la capacidad de respuesta deteriorada, observada en las células T, a las acciones de las MDSC derivadas de la MO. Además, las citocinas supresoras de las MDSC supresoras del MDS, como la IL-10 y TGF- β (Figura 1F y G), así como el óxido nítrico (NO) y la arginasa, en comparación con las MDSC aisladas de donantes sanos (Figura 1H e I). En conjunto, estos datos demuestran que las MDSC LIN⁺HLA-DR⁺CD33⁺ son un subconjunto celular único y funcional que admite un microentorno proinflamatorio y tolerancia inmune en la MO de pacientes con MDS.

Las funciones supresoras y citotóxicas mediadas por MDSC requieren contacto directo con las células diana. Un mecanismo usado por los efectores citotóxicos es la movilización de gránulos formadores de poros y la liberación de proteasas efectoras activadoras de caspasas, como la granzima B, al sitio del efector: el contacto diana induciendo así la apoptosis de la célula diana (Chen, X. y col. 2008 Blood 113(14):3226-34). Dado que las MDSC residen en estrecha proximidad con las células progenitoras hematopoyéticas (HPC), que en el MDS muestran una mayor tasa apoptótica, la actividad citostática mediada por MDSC puede contribuir a la muerte por HPC. Para abordar esto, se examinaron la movilización de gránulos de las MDSC del MDS y la liberación de granzima B usando tinción de inmunofluorescencia de cuatro colores. Las MDSC del MDS exhibieron una fuerte polarización de granzima B en el sitio de contacto celular con precursores eritroides autólogos de CD235a⁺ (glicoforina A)/CD71⁺ (Figura 1J). Después de 30 minutos de incubación, la frecuencia de tales conjugados efector-diana en especímenes de pacientes con MDS fue significativamente mayor (34%) que en muestras de donantes sanos (5% $P < 0,001$, Figura 1K y L). Estas interacciones celulares dieron como resultado la apoptosis de precursores eritroides dirigidos (Figura 1M), lo que demuestra que, además de las funciones inmunosupresoras mediadas por MDSC conocidas, existe una capacidad supresora hematopoyética mediada por MDSC no reconocidas. Para corroborar este hallazgo, se examinaron los efectos de las MDSC sobre la capacidad proliferativa de las HPC en especímenes de MO de pacientes desprovistos de MDSC del MDS y con HSPC enriquecidas, en un ensayo de formación de colonias de metilcelulosa. La unidad formadora de brotes (UFB-E) y la unidad formadora de colonias de granulocitos/macrófagos (UFC-GM) fueron significativamente mayores en especímenes desprovistos de MDSC en comparación con muestras complementadas con MDSC y sin clasificar (Figura 1N), lo que demuestra que las MDSC presentan un papel supresor directo en el desarrollo de células progenitoras eritroides y mieloides.

El aumento de la expresión y señalización de CD33 contribuye a las funciones supresoras de las MDSC y al deterioro hematopoyético. Las MDSC en humanos expresan característicamente la glucoproteína transmembrana de superficie CD33, un receptor Siglec 3 que, junto con otros miembros de esta familia, presenta un papel destacado en la inflamación (Crocker, P.R., y col. 2007 Nat Rev Immunol 7:255-266; Blasius, A.L., y col. 2006. Blood 107:2474-2476; Blasius, A.L., y col. 2006. Trends Immunol 27:255-260; Lajaunias, F., y col. 2005. Eur J Immunol 35:243-251; Nutku, E., y col. 2003. Blood 101:5014-5020; von Gunten, S., y col. 2008. Ann N Y Acad Sci 1143:61-82; Paul, S.P., y col. 2000. Blood 96:483-490; Ulyanova, T., y col. 2001. J Biol Chem 276:14451-14458; Avril, T., y col. 2004. J Immunol 173:6841-6849; Ikehara, Y., y col. 2004. J Biol Chem 279:43117-43125). Sin embargo, la participación de CD33 en la mielopoyesis permanece sin ser explorada. Por tanto, se investigó la relación entre la densidad de expresión de membrana de CD33 en MDSC del MDS y su activación y mantenimiento en la MO del MDS. Se descubrió que estas células expresan de manera robusta CD33 en niveles superiores a las células LIN⁺HLA-DR⁺CD33⁺ aisladas de pacientes con cáncer no asociados a MDS y células de la MO de donantes sanos (Figura 2A). Para explorar las consecuencias funcionales del compromiso del CD33, el CD33 se reticuló en células U937 (una línea celular monocítica humana con alta expresión de CD33), lo que desencadenó la secreción de IL-10, TGF- β y VEGF (Figura 2B). Para examinar si el CD33 puede promover la acumulación y/o la activación de las MDSC, el CD33 se sobreexpresó con un vector de adenovirus en MNC de la MO de donantes sanos, lo que suprimió significativamente el desarrollo de células mieloides, como lo demuestra la expresión reducida de los marcadores de maduración CD11c, CD80 y CCR7 (Figura 2C). Para establecer adicionalmente el papel del CD33 en la supresión de la MO mediada por MDSC, se derribó el CD33 en MDSC con MDS usando un vector lentiviral (LV) que contenía ARNhc específico de CD33. El cocultivo de HPC autólogas con MDSC del MDS tratadas con ARNhc de CD33 dio como resultado un aumento de 2 a 3 veces en la recuperación de colonias de las UFB-E y las UFC-GM, en comparación con las cultivadas con MDSC del MDS, tratadas con ARNhc revuelto y no transducidas y MDSC de la MO de un donante sano (Figura 2D). Además, la producción de IL-10, TGF- β y arginasa se redujo en las MDSC del MDS tratado con ARNhc de CD33, en comparación con las células de control (Figura 2E, F, G). Colectivamente, estos datos delinean un papel de CD33 en la activación y expansión de las MDSC en el MDS y la dirección del deterioro hematopoyético.

S100A9 es un ligando nativo para CD33. Aunque estas investigaciones mostraron que CD33/Siglec 3 es un receptor clave involucrado en la activación funcional de las MDSC, su ligando nativo era desconocido. Por lo tanto, para

identificar el(los) ligando(s) potencial(es) para este receptor, se produjo una proteína de fusión quimérica con el ectodominio CD33 y la porción Fc de la IgG humana (en lo sucesivo denominada fusión de CD33). Los lisados de células de la MO de pacientes con MDS se inmunoprecipitaron con la fusión de CD33, seguido de un análisis espectrométrico de masas de alto rendimiento en péptidos asociados. La S100A9, una molécula de señalización inflamatoria que se sabe que activa las MDSC, se encontraba entre las bandas de proteínas más prominentes identificadas (Figura 3A). Para confirmar la especificidad de la unión de este DAMP a CD33, se prepararon transfectantes S100A8 y S100A9 en la línea celular de rhabdomyosarcoma SJCRH30, que carece de expresión detectable de CD33, S100A8 o S100A9 endógenos. La fusión de CD33 (APC) tiñó solo células transfectadas con S100A9, pero no las células transfectadas con S100A8, confirmando la especificidad de unión (Figura 3B). Los transfectantes se tiñeron con FITC y la unión específica por la fusión de CD33 se tiñó con APC (los núcleos se tiñeron con DAPI). La unión directa de S100A9 a CD33 se confirmó adicionalmente en un ELISA sándwich donde el anticuerpo de captura era anti-S100A9 (Figura 3C), así como por análisis de transferencia de punto de lisados celulares transfectados con fusión de CD33 (Figura 3D), lo que demuestra la especificidad de la interacción. Para corroborar por completo la unión de este par, se realizó una precipitación inmune inversa en células transfectadas con CD33 que muestra que S100A9 coprecipitó con CD33 solo en células con cotransfectadas con S100A9 (Figura 3E). Para validar clínicamente la especificidad del ligando en pacientes con MDS, se comparó el desplegable con la fusión de CD33 de PBMC y MO sanos, así como también con pacientes con MDS. Como se esperaba, la mayor cantidad de S100A9 se precipitó de los especímenes de pacientes de MO con MDS (Figura 3F). A continuación, para comprender la cinética de las interacciones S100A9 y CD33, las células SJCRH30 se transfectaron con el vector o CD33 y se incubaron con S100A9 humano recombinante (rh) marcado con DDK (epítipo DYKDDDDK, mismo epítipo que Flag). Esto dio como resultado un aumento dependiente del tiempo en la unión de rhS100A9 a las células SJCRH30-CD33 estables, pero no a la unión a las células transfectadas con el vector (Figura 3G). Para demostrar la funcionalidad de este par de ligadura, se adicionó rhS100A9 a las células SJCRH30-CD33, lo que desencadenó la regulación positiva mediada por CD33 de la expresión de IL10 y TGFβ (Figura 3H e I). Para confirmar que rhS100A9 puede recapitular estas observaciones de la secreción de estas citocinas después de la reticulación de CD33, los experimentos se repitieron en células U937 con rhS100A9 y se descubrió nuevamente un aumento en la producción de ambas citocinas (Figura 3J y K). Es importante destacar que la concentración plasmática de la MO de S100A9 aumentó significativamente en pacientes con MDS, en comparación con el plasma de la MO de donantes sanos (Figura 3L). Además, el compromiso de CD33 con rhS100A9 en las MDSC con MDS de la MO del paciente resultó en una coubicación dependiente del tiempo de este par ligando/receptor en células primarias de la MO con MDS (Figura 3M). Es bien reconocido que el CD33 señala a través de la fosforilación de ITIMs que reclutan SHP-1 (fosfatasa-1, que contiene el dominio de la región 2 de homología Src). La ligadura rhS100A9 aumentó correspondientemente el reclutamiento de SHP-1, confirmando que CD33 señala a través de su ITIM después de la ligadura S100A9 en la MO del MDS (Figura 3N). Además, el tratamiento directo de SJCRH30 transfectada con CD33 con el plasma de la MO de pacientes con MDS desencadenó el reclutamiento de SHP-1 a ITIM, en comparación con las células tratadas con plasma de donantes sanos, lo que sugiere que una mayor secreción de S100A9 en el microentorno local de la MO podría cumplir una función en la activación de la señalización CD33-ITIM (Figura 3O).

El engranaje de S100A8/S100A9 de CD33 desencadena la activación de las MDSC del MDS. Habiendo establecido S100A9 y CD33 como un par ligando/receptor funcional, se exploró el papel de esta interacción en la replicación de las respuestas funcionales observadas con la reticulación del receptor. La sobreexpresión de CD33 se indujo nuevamente en células sanas de la MO a través de la transfección de adenovirus y se estudiaron sus propiedades inmunosupresoras con o sin la adición de rhS100A9. La expresión forzada de CD33 indujo un aumento paralelo en la expresión génica y la secreción de las citocinas supresoras, IL-10 y TGFβ (barras de color gris claro, Figura 4A-D), que se incrementó en gran medida por la adición de rhS100A9 (barras negras). La secreción de la citocina supresora TGFβ solo se observó después del tratamiento con rhS100A9 de las células transfectadas con CD33 (Figura 4D), acompañada de un aumento en la expresión de NOS2 y ARG2, consistente con el perfil de citocina supresora (Figura 4E y F). La Figura 4G-H demuestra la eficiencia de transfección del adenovirus CD33 tanto en el nivel de expresión de genes como de proteínas medido por QPCR y GFP por citometría de flujo, respectivamente.

Para delinear adicionalmente el papel específico de la ligadura de S100A9 con CD33 en comparación con sus otros ligandos, RAGE, TLR4, CD33, así como también cada par, fueron bloqueados con anticuerpos antes de tratar las células sanas de la MO con rhS100A9. Estos datos muestran que el bloqueo de CD33 redujo la producción de IL-10 y TGFβ, mientras que el tratamiento con anti-RAGE y anti-TLR4 no presentó efectos significativos en la producción de IL-10, pero mostró una modesta supresión de la secreción y expresión de TGFβ (Figura 4I y J). Estos hallazgos sugieren que, aunque el CD33 desempeña un papel crítico en la secreción de ambas citocinas, otros receptores asociados con la inflamación local de la médula ósea también pueden presentar una contribución. Para confirmar que la expresión de S100A9 contribuye a la inflamación en el microentorno de la MO, tanto S100A8 como S100A9 se redujeron en las MDSC del MDS usando ARNhc específicos de genes (Figura 4K). Dado que S100A9 generalmente se empareja con S100A8 como un heterodímero y ambos están regulados concomitantemente, no fue sorprendente que hubiera cambios recíprocos en la expresión génica con regulación negativa en la expresión de la proteína alternativa. Es importante destacar que la reducción de la expresión de S100A8/S100A9 atenuó profundamente la

producción de IL-10 y TGF- β (Figura 4L y M) y rescató la formación de colonias autólogas de la UFB-E y la UFC-GM (Figura 4N). Estos datos muestran que la señalización de S100A8/S100A9 asociada a inflamación juega un papel crítico en la activación de las MDSC del MDS y suprime la hematopoyesis normal.

- 5 *Los ratones transgénicos S100A9 recapitulan las características del MDS humano.* Dados los hallazgos de que el S100A8/S100A9 dispara la señalización de CD33/Siglec 3 y está involucrado en la activación de las MDSC (Ehrchen, J.M. y col. 2009 J Leukoc Biol 86:557-566; Vogl, T., y col. 2007. Nat Med 13:1042-1049; Cheng, P., y col. 2008. J Exp Med 205:2235-2249), se generaron ratones transgénicos S100A9 (S100A9Tg) para estudiar la inflamación asociada a las MDSC (Cheng, P. y col. 2008 J Exp Med 205:2235-2249). Dado que el MDS es una enfermedad asociada a la
- 10 edad, los cambios en la proporción de MDSC de la MO (células Gr1⁺CD11b⁺) con la edad se analizaron en S100A9Tg, en comparación con la eliminación de S100A9 (S100A9KO) (Manitz, M.P., y col. 2003. Mol Cell Biol 23:1034-1043) o ratones de tipo salvaje (TS) a las 6, 18 o 24 semanas de edad. Esto dio como resultado una marcada acumulación de MDSC dependiente de la edad en la MO de los ratones S100A9Tg, pero no en los ratones S100A9KO o TS, que alcanzó su máximo en 24 semanas (Figura 5A). Del mismo modo, la proporción de MDSC en PBMC y el bazo también
- 15 aumentó con la edad (Figura 5B). Aunque los cambios en la proporción de las MDSC en el bazo fueron comparativamente menores que en la MO, estuvieron acompañados de una disminución en la proporción de células maduras (Figura 5C y 5D), aumentando efectivamente la proporción de células inmaduras a maduras en este órgano hematopoyético. Funcionalmente, solo las MDSC de los ratones S100A9Tg de 24 semanas de edad, pero no los ratones S100A9KO o WT, inhibieron significativamente la formación de UFB-E (Figura 5E) y UFC-GM, que fueron
- 20 rescatadas después de desproveer al grupo S100A9Tg de las MDSC (Figura 5E). Es importante destacar que, como evidencia adicional del papel de S100A9 como factor inflamatorio esencial que regula la expansión de MDSC y la actividad supresora, la secreción de IL-10 y TGF- β aumentó significativamente en ratones S100A9Tg en comparación con KO o animales de tipo salvaje (Figura 5F).
- 25 Para evaluar las consecuencias *in vivo* de la sobreexpresión de S100A9 en la hematopoyesis, se analizaron hemogramas completos en serie de ratones TS y S100A9Tg a las 6, 18 y 24 semanas de edad. Los ratones S100A9Tg desarrollaron citopenias progresivas multilinea caracterizadas por la disminución de la hemoglobina (Hgb), el número de glóbulos rojos (GR), los recuentos de neutrófilos y plaquetas ya evidentes a las 6 semanas de edad. A las 18 semanas, los ratones S100A9Tg exhibieron anemia y trombocitopenia severas con una disminución de más del 22,0%
- 30 en los glóbulos rojos, una disminución del 20,1% en la Hgb y una disminución del 77,8% en las plaquetas (Tabla 2). El examen histológico de aspirados de la MO y secciones de biopsia de ratones TS mostró características morfológicas y citológicas normales (Figura 5G-J). Por el contrario, la MO de los ratones S100A9Tg era hiper celular (95% de celularidad) acompañada de displasia citológica de tres linajes (Figura 5K-N). La morfología de los megacariocitos recapitula las características displásicas características del MDS humano, con una preponderancia de formas
- 35 mononucleares o hipolobadas. Los precursores eritroides mostraron maduración megaloblastoide con hemoglobina anormal y binucleación ocasional. La gemación nuclear y las formas mitóticas extrañas también fueron evidentes (Figura 5K-N). Las citopenias empeoraron con la edad y, a las 24 semanas, los ratones S100A9Tg desarrollaron una pancitopenia grave (las descripciones detalladas se resumen en la leyenda de la figura). Aunque este modelo replica estrechamente el medio inflamatorio observado en el MDS humano, las HSPC de ratones
- 40 S100A9Tg también expresan la proteína S100A9. Dado que no se conoce la procedencia de esta proteína en el MDS humano, se investigó la expresión celular de S100A9 en MNC de la MO con MNC mediante citometría de flujo. Se detectó tinción intracelular S100A9 en las células CD33⁺, mientras que las HSC CD34⁺ no presentaban una expresión demostrable de S100A9 (Figura 5O y 5P). La expresión de S100A9 no se detectó en otras células inmunes como los linfocitos CD3⁺, las células CD19⁺ B o las células CD56⁺ NK.

45

Tabla 2. Hemograma completo de sangre periférica de ratones S100A9Tg y TS

Prueba	Unidades	6 semanas		18 semanas		24 semanas	
		TS	S100A9-Tg	TS	S100A9-Tg	TS	S100A9-Tg
Glóbulos blancos	10 ³ / μ l	5,4 $\pm$ 0,5	4,2 $\pm$ 1,5	6,0 $\pm$ 1,4	2,9 $\pm$ 0,2*	6,3 $\pm$ 0,8	3,0 $\pm$ 0,4*
LYM	10 ³ / μ l	3,9 $\pm$ 0,5	2,6 $\pm$ 1,2	4,7 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 0,1*	4,8 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,3*
MONO	10 ³ / μ l	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1*	0,4 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1*
GRAN	10 ³ / μ l	1,1 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 1,2	0,9 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2*	1,1 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1**
HCT	%	48,1 $\pm$ 3,2	42,4 $\pm$ 2,1	45,7 $\pm$ 0,7	35,5 $\pm$ 3,0**	45,4 $\pm$ 3,5	32,1 $\pm$ 2,7**
VCM	fl	51,4 $\pm$ 1,6	49,8 $\pm$ 2,0	50,3 $\pm$ 0,5	50,0 $\pm$ 1,2	50,0 $\pm$ 1,3	50,0 $\pm$ 1,6
ADGRa	fl	35,0 $\pm$ 0,7	33,2 $\pm$ 2,2	34,0 $\pm$ 1,3	32,5 $\pm$ 1,7	33,3 $\pm$ 1,4	32,2 $\pm$ 1,5

Tabla 2. Hemograma completo de sangre periférica de ratones S100A9Tg y TS

Prueba	Unidades	6 semanas		18 semanas		24 semanas	
		TS	S100A9-Tg	TS	S100A9-Tg	TS	S100A9-Tg
ADGR%	%	16,3±0,7	15,9±0,1	16,3±0,5	15,5±0,5	16,0±0,5	15,4±0,6
HGB	g/dl	14,2±0,8	13,0±0,7	13,9±0,3	11,1±0,7**	13,7±0,6	10,3±0,5**
CHCM	g/dl	29,5±1,1	30,6±1,3	30,4±0,4	31,5±0,9	30,3±1,0	32,3±1,1
HCM	pg	15,1±0,3	15,2±0,1	15,3±0,1	15,8±0,3	15,2±0,2	16,2±0,4
GR	10 ⁶ /μl	9,4±0,7	8,5±0,4	9,1±0,1	7,1±0,6**	9,1±0,3	6,4±0,2***
Plaquetas	10 ³ /μl	555,7±96,6	412,0±124,0	431,3±33,9	95,7±35,0***	437,0±41,9	61,0±23,5***

Todos los datos son medias ± EEM (n = 3-5 ratones). Se prepararon muestras de sangre periférica de ratones S100A9Tg y control (TS) en edades de 6, 18 y 24 semanas y se analizaron en un Analizador de Hematología Hema True (Heska). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 versus ratones TS

Análisis del papel de las MDSC mediante transferencia adoptiva de HSC enriquecidas de ratones S100A9Tg. Para delinear con mayor precisión el papel de las MDSC de los ratones S100A9Tg en la hematopoyesis, se realizó una transferencia adoptiva competitiva de HSC enriquecidas en ratones FVB/NJ hembra, irradiados letalmente (900 cGy) con HSC TS, S100A9Tg HSC o una mezcla (proporción 1:1) de HSC de la MO enriquecidas de ratones machos. Usando un enfoque de PCR de expresión de gen SRY de macho a hembra para monitorizar el injerto, todos los ratones experimentaron un injerto mayor al 80% (Figura 8). Después del injerto (definido como Recuento de glóbulos blancos > 3x10³ células/μL en receptores de TS a las 8 semanas), los receptores de HSC TS presentaban proporciones tanto de Cr1⁺Cd11b⁺ derivadas de la MO como de HSC (Figura 6A y C) que fueron comparables a los niveles en ratones TS no trasplantados (Figura 5A). A diferencia de esto, la transferencia adoptiva con HSC enriquecidas con S100A9Tg generó una alta proporción de GFP que expresa MDSC Gr1⁺Cd11b⁺ (Figura 6B) acompañadas de una proporción reducida de HSC, hallazgos análogos a nuestras observaciones en ratones transgénicos más viejos (Figura 6C). Sin embargo, los ratones que recibieron la población de HSC mezclada presentaban una proporción de MDSC que se aproxima a la de los ratones TS transferidos adoptivamente (~30%). En particular, casi el 50% de las MDSC carecían de expresión de GFP, lo que indica el origen de las HSPC TS (Figura 6B), mientras que las células MDSC GFP⁺ restantes se derivaron de células donantes S100A9Tg. Aunque la población total de MDSC no aumentó al nivel observado en los ratones S100A9Tg transferidos adoptivamente, se observó una disminución de la proporción de HSC a los niveles descubiertos en ratones trasplantados con células donantes S100A9Tg (Figura 6C). Estos hallazgos indican que la población más pequeña de MDSC activadas de células donantes S100A9Tg presentaba suficiente actividad supresora para producir un deterioro comparable en la integridad hematopoyética. Estos hallazgos fueron respaldados por análisis secuenciales de hemogramas de sangre periférica, en los que los receptores de trasplante de origen mixto presentaban citopenias de gravedad intermedia, en comparación con los ratones que recibieron las células donantes S100A9Tg o TS (Figura 6D, E, F). Lo que resulta interesante es que, mientras los receptores de donantes mixtos presentaban la misma proporción de HSC después del injerto que los ratones trasplantados con Tg, sus recuentos de glóbulos blancos fueron más altos que aquellos de los ratones trasplantados con HSC de S100A9Tg y más bajos que los niveles en los receptores de HSC de TS. Del mismo modo, el inicio de la anemia se retrasó en los receptores de las células donantes mixtas versus S100A9Tg. Estos hallazgos sugieren que las HSC normales de los ratones TS pueden rescatar parcialmente la hematopoyesis, pero, con el tiempo, la hematopoyesis se suprime al acumular MDSC derivadas de las células donantes de S100A9Tg.

Para determinar si el S100A9 solo presenta efectos directos sobre las HSC, MO CD34⁺ (desprovistas de MDSC, MDSC-) del MDS, los especímenes de pacientes se trataron con rhS100A9 durante 24 y 48 horas y se evaluó la apoptosis mediante citometría de flujo. Se observó una disminución en el número de HSPC CD34⁺ después del tratamiento, en comparación con los controles acompañados de un aumento correspondiente en la fracción apoptótica entre las células supervivientes después de 48 horas de exposición (Figura 6G y H). Para corroborar estos hallazgos, las células CD34⁺ sanas derivadas de la médula ósea (Lonza, Wakerfield) se cultivaron con rhS100A9 y se observó nuevamente una disminución de las células viables después del tratamiento (un 50,7% de viabilidad en las células de control frente a un 24,7% en las células tratadas con rhS100A9, Figura 6I). Estos hallazgos sugieren que el S100A9 presenta un efecto apoptótico directo en las HSC humanas.

La maduración forzada de las MDSC restaura la hematopoyesis. Para confirmar la función efectora de las MDSC e investigar el beneficio potencial de la supresión dirigida de las MDSC, los ratones S100A9Tg fueron tratados con ácido *todo*transretinoico (ATRA). El ATRA induce la diferenciación de las MDSC en células mieloides maduras y neutraliza

la producción de ROS, extinguiendo así la MDSC a través de la diferenciación de extremo forzada (Nefedova, Y., y col. 2007 Cancer Res 67:11021-11028; Mirza, N., y col. 2006. Cancer Res 66:9299-9307). Con este fin, se examinó si el ATRA induciría la diferenciación de las MDSC en ratones S100A9Tg y mejoraría la hematopoyesis. Los ratones S100A9Tg y TS se trataron con ATRA (250 µg/200 µl) o control de vehículo por vía oral durante cinco días consecutivos. Dos días después de completar el tratamiento, ATRA redujo el número total de las MDSC, mientras que los números en ratones TS permanecieron en niveles basales (Figura 7A). Las reducciones en el número de las MDSC en ratones S100A9Tg se acoplaron a un aumento en las células maduras después del tratamiento con ATRA (Figura 7B). El tratamiento de especímenes primarios de MO del MDS con ATRA también redujo la acumulación de MDSC *in vitro*. Es importante destacar que los cultivos progenitores de la MO de ratones S100A9Tg tratados con ATRA mostraron una recuperación de UFB-E significativamente mejorada, en comparación con los controles tratados con el vehículo (Figura 7C). El análisis de los cambios en los recuentos de sangre periférica mostró que los recuentos de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas aumentaron significativamente, en comparación con los controles tratados con el vehículo (Figura 7D), lo que indica que la diferenciación de extremo de las MDSC puede restaurar la hematopoyesis efectiva.

Las investigaciones mostraron que las MDSC emplean ITIM asociados a CD33 para inhibir su propia maduración celular (Figura 3N y O). Sin embargo, las señales ITIM pueden anularse mediante señales mediadas por el motivo de inmunorreceptor activable por tirosina (ITAM) estimulante (Lanier, L.L. 2005. Annu Rev Immunol 23:225-274; Ravetch, J.V., y col. 2000. Science 290:84-89). Algunos receptores relacionados con CD33, como ciertos Siglecs, carecen de ITIM y, en cambio, funcionan como receptores activadores. Se ha demostrado que Siglec-H de ratón y Siglec-14 humano interactúan con DAP12 (Blasius, A.L. y col. 2006 Blood 107:2474-2476; Blasius, A.L., y col. 2006. Trends Immunol 27:255-260; Angata, T., y col. 2006. Faseb J 20:1964-1973; Lanier, L.L., y col. 1998. Nature 391:703-707), un adaptador que contiene ITAM que puede promover la maduración de las células mieloides (Figura 9) e inhibir la activación de TLR-4 (Turnbull, I.R., y col. 2007 Nat Rev Immunol 7:155-161). La expresión génica de Rhe DAP12 de MDSC purificadas del MDS (n = 5) se comparó con las MDSC de donantes sanos de la misma edad (n = 5). El ARNm de DAP12 fue significativamente menor en las MDSC del MDS en todos los especímenes analizadas (Figura 7E). Se razonó que anular la señalización de CD33-ITIM a través de DAP12 induciría la diferenciación de estas células mieloides inmaduras y mejoraría la hematopoyesis. Para probar esto, se creó una forma constitutivamente activa de DAP12, llamada P23, y las células AD293 se transfectaron con GFP, TS-DAP12, o vectores virales de P23 DAP12activos. Los resultados muestran que P23 se une a la quinasa Syk y activa la señalización aguas abajo en las células AD293 transducidas sin estimulación externa (Figura 7F). Además, P23 promueve la maduración primaria de DC humana, como se demuestra mediante la regulación positiva de los antígenos CD80, CD83 y CCR7 (Figura 10) (Blasius, A.L. y col. 2006 Blood 107:2474-2476; Blasius, A.L., y col. 2006. Trends Immunol 27:255-260). En base a estos hallazgos, es posible que P23 pueda inducir la maduración de las MDSC del MDS y, así, evitar o interrumpir la supresión hematopoyética. Para probar esto, la expresión de los marcadores de superficie monocítica y granulocítica humana CD14 y CD15 se analizó después de la transfección (Araki, H. y col. 2004 Blood 103:2973-2980) y los resultados mostraron que, mientras la transfección de DAP12 de TS sola fue suficiente para inducir la regulación positiva de CD14 y CD15, la transfección de P23 indujo una expresión aún mayor de ambos marcadores de maduración (Figura 7G). Además, P23 promovió la maduración de las MDSC del MDS primarias, como se demuestra mediante la regulación positiva de los marcadores de maduración CD80, CD83 y CCR7 (Figura 7H). Por último, para probar si la maduración de las MDSC mediada por DAP12 alivió la supresión de la eritropoyesis, se purificaron MDSC del MDS de siete pacientes con MDS e infectadas con control, DAP12 de TS o construcciones lentivirales P23. Para evaluar la función supresora de las MDSC del MDS maduras en la hematopoyesis, se evaluó la capacidad de formación de colonias después del cultivo de células infectadas con células autólogas de la MO desprovistas de MDSC. Los cocultivos de las MDSC del MDS infectados con P23 produjeron un número de colonias significativamente mayor que el vector viral de control o los cocultivos de MDSC del MDS infectados con DAP12 de TS (Figura 7I). Estos hallazgos indican que el DAP12 anula la señalización ITIM asociada a CD33 para estimular la maduración de las MDSC y revertir los efectos supresores sobre la capacidad de formación de colonias de HPC.

50 **Análisis de resultados**

Los estímulos inflamatorios dentro del microentorno de la MO se reconocen como señales biológicas importantes que estimulan la proliferación de células progenitoras y la apoptosis en el MDS. Un reciente estudio basado en la población amplió esto adicionalmente al demostrar un fuerte vínculo entre la estimulación inmune crónica y la predisposición al MDS (Kristinsson, S.Y., y col. 2011 J Clin Oncol 29:2897-2903). Las pruebas definitivas de que las anomalías intrínsecas de nicho por sí solas pueden explicar el desarrollo de MDS de una manera celular no autónoma son limitadas. Raaijmakers y sus colegas mostraron que la disfunción osteoprogenitora selectiva provocada por la eliminación de *Dicer1* en el componente mesenquimatoso del microentorno de la MO fue suficiente para perturbar la hematopoyesis y conducir al desarrollo de displasia mielóide, seguida de la aparición secundaria de anomalías genéticas restringidas por mieloides (Raaijmakers, M.H., y col. 2010 Nature 464:852-857).

Los estudios descritos muestran que las MDSC Lin⁻HLA-DR⁺CD33⁺ se acumulan en la MO de los pacientes con MDS,

se derivan de una población distinta del clon neoplásico y sirven como efectores celulares que suprimen la hematopoyesis, promueven la tolerancia de las células T y sirven como una fuente clave de moléculas mielosupresoras e inflamatorias como IL-10, TGF- β , NO y arginasa. Usando múltiples enfoques biológicos y bioquímicos, se demostró que el S100A9, también conocido como proteína 14 relacionada con el factor inhibidor de la migración (MRP-14) o calgranulina-B, puede servir como un ligando nativo endógeno para CD33/Siglec 3. Además, la expansión forzada de las MDSC por la sobreexpresión del S100A9 en ratones transgénicos inicia el desarrollo de características hematológicas que fenocopia el MDS humano, específicamente hematopoyesis displásica y no efectiva, dependiente de la edad progresiva. Estos hallazgos indican que la expansión de un solo componente celular del microentorno de la MO es suficiente para fomentar el cambio neoplásico en los progenitores mieloides heterólogos a través de la oncogénesis conductora del nicho. La acumulación de MDSC dependiente del tiempo en el modelo de ratón transgénico es paralela a los hallazgos humanos recientes de que las MDSC se expanden con la edad, lo que es acompañado por niveles séricos crecientes de citocinas proinflamatorias (por ejemplo, TNF- α , IL-6 e IL-1 β), lo que proporciona evidencia de dicha senescencia. Los cambios dependientes que impulsan la expansión de las MDSC pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis dependiente de la edad de MDS (Verschoor CP, y col. 2013 *J Leukoc Biol* 93(4):633-7). Es importante destacar que el fenotipo LIN⁺HLA-DR⁺CD33⁺ no solo confiere la función de la célula supresora, como lo demuestra la falta de supresión de MDSC LIN⁺HLA-DR⁺CD33⁺ de donantes sanos compatibles con la edad o pacientes con cáncer no del MDS. Los estudios descritos demuestran la necesidad de la activación de la señalización inmune innata y la generación de moléculas proinflamatorias, como S100A9, para la inducción de la función supresora mediada por las MDSC del MDS. Además, el hallazgo descrito de que las MDSC humanas primarias del MDS carecen de anomalías genéticas moleculares intrínsecas al clon maligno indica que las MDSC derivan de HSC no neoplásicas, y que la activación y expansión de las MDSC probablemente preceda a la aparición de clones del MDS genéticamente distintos.

El CD33, un receptor Siglec expresado por muchas células inmunes, incluyendo las MDSC, se muestra en esta invención como sobreexpresado notablemente por las MDSC del MDS, y se muestra que este receptor controla las funciones supresoras de las MDSC del MDS a través de la interrupción de la señalización mediada por ITIM. Además, los hallazgos descritos de que rhS100A9 desencadena directamente la apoptosis en HPC humanas indica que este ligando presenta un papel doble en la promoción de la hematopoyesis inefectiva que involucra mecanismos celulares (MDSC) y humorales (CD33, TLR4). Además, la respuesta celular al acoplamiento del ligando CD33 parece específica del tipo de célula, es decir, apoptosis en HPC versus activación y proliferación en MDSC. La regeneración compensatoria dentro del compartimiento mielode podría explicar el aumento del índice proliferativo observado en el MDS (Raza y col. Alabama. 1995 *Sangre* 86(1):268-276) y el sesgo mielode preferencial que ocurre con la edad. Por lo tanto, la sobreexpresión de CD33 puede perjudicar las señales de maduración de los receptores asociados a ITAM que es crítica para la expansión de las MDSC inmaduras (Figura 7G y H). Según esto, el silenciamiento de ARNhc de CD33 redujo la elaboración de citocinas mielosupresoras y, lo que es más importante, restauró la capacidad de formación de colonias progenitoras hematopoyéticas. Además, la señalización constitutivamente activa de DAP12 fue suficiente para anular la inhibición de CD33-ITIM e inducir la diferenciación de las MDSC, que restableció la eritropoyesis tras la transfección de DAP12 activa en MDSC del MDS. Lo que resulta más importante, la activación de DAP12 puede inhibir las vías de señalización mediadas por TLR, que también pueden desempeñar un papel en la supresión de la MO mediada por inflamación (Turnbull, I.R., y col. 2007 *Nat Rev Immunol* 7:155-161; Hamerman, J.A., y col. 2006. *J Immunol* 177:2051-2055).

La creciente evidencia involucra la activación de la señalización inmune innata en la patogénesis y las características biológicas del MDS humano (Hofmann, W.K., y col. 2002. *Blood* 100:3553-3560; Gondek, L.P., y col. 2008. *Blood* 111:1534-1542; Starczynowski, D.T., y col. 2008. *Blood* 112:3412-3424). En MDS del(5q), la eliminación alélica de miR-145 y miR-146a da como resultado la represión de las dianas respectivas, TIRAP y TRAF6. Resulta de particular importancia que Starczynowski y sus colegas demostraron que la eliminación de estos miR específicos o la sobreexpresión de TRAF6 en HSPC murino recapituló las características hematológicas de MDS del(5q) en un modelo de trasplante a través de mecanismos tanto autónomos como no autónomos que involucran la interleucina-6 (Starczynowski, D.T., y col. 2010 *Nat Med* 16:49-58; Starczynowski, D.T., y col. 2010. *Hematol Oncol Clin North Am* 24:343-359). Los estudios descritos muestran que el DAMP S100A8/S100A9 heterodimérico, liberado específicamente en los sitios inflamatorios de la MO, no solo se expresa de manera aberrante en el MDS, sino que sirve como ligando nativo para el CD33. Este hallazgo proporciona evidencia de que las proteínas S100 contribuyen directamente a la patogénesis del MDS a través de mecanismos no autónomos celulares dirigidos por el microentorno que involucran MDSC (Ehrchen, J.M. y col. 2009 *J Leukoc Biol* 86:557-566; Viemann, D., y col. 2007. *Blood* 109:2453-2460). Además, la activación de TLR suprime la diferenciación de osteoblastos, al tiempo que instruye el compromiso mielode en HSC (Bandow, K. y col. 2010 *Biochem Biophys Res Commun* 402:755-761; De Luca, K., y col. 2009. *Leukemia* 23:2063-2074). Por lo tanto, la activación prolongada de la señalización inmune innata con la edad puede alterar el nicho endosteal de la MO que apoya el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y favorecer la translocación de las progenitoras mieloides a un nicho angiogénico característico del MDS (Bellamy, W.T. y col. 2001 *Blood* 97:1427-1434). Esto es respaldado por los hallazgos descritos sobre el desarrollo, en función de la edad, de citopenias con emergencia de características citológicas displásicas en los ratones S100A9Tg. Más importante aún,

los experimentos competitivos de trasplante mostraron que la mezcla de S100A9Tg con retrasos de HSC de donantes de TS, aunque con el tiempo, todavía afecta la hematopoyesis.

- Los hallazgos descritos respaldan un modelo para la patogénesis del MDS en el que la activación sostenida de la señalización inmune innata en el microentorno de la MO crea un medio inflamatorio permisivo que es suficiente para el desarrollo de mielodisplasia. Las células progenitoras hematopoyéticas neoplásicas autónomas pueden surgir después de la adquisición de anormalidades genéticas secundarias en el compartimento mieloide. Los ratones S100A9Tg simulan el MDS humano y pueden servir como un modelo *in vivo* para estudiar la patogénesis del MDS y el desarrollo de nuevas terapias. Sin embargo, las intervenciones terapéuticas que promueven la maduración de las MDSC pueden presentar un potencial de remisión cuando se aplican al inicio de la enfermedad.

Ejemplo 2

- Se evaluó la generación de caspasa-1 (Tabla 3) e IL-1 β (Tabla 4) activa en cuatro poblaciones: células madre (CD34 + CD38-), progenitoras (CD34+CD38+), eritroides (CD71+) y células mieloides (CD33+). Los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. El tratamiento con IgG de CD33 disminuye la generación de caspasa-1 activa en un espécimen del MDS.

	Células madre	Progenitoras	Eritroides	Mieloides
Tipo de valor de subconjunto de ascendencia para	Geom. VIVA/CD34+/MADRE Media de <FITC-A> FAM FLICA	Geom. VIVA/CD34+/PROGENITORA Media de <FITC-A> FAM FLICA	Geom. VIVA/CD71+ Media de <FITC-A> FAM FLICA	Geom. VIVA/CD33+ Media de <FITC-A> FAM FLICA
SIN TINCIÓN	731	5760	189	3908
SOLO PLASMA	7062	61966	4170	44708
1 μ g IgG	4316	38250	2836	37161
0,1 μ g IgG de CD33	5232	43019	3339	40221
0,5 μ g IgG de CD33	5015	48556	3135	41516
1 μ g IgG de CD33	3444	24089	2247	19533

Tabla 4. El tratamiento con IgG de CD33 disminuye la generación de IL-1 β en un espécimen del MDS.

Tipo de valor de subconjunto de ascendencia para	Geom. VIVA/CD34+/MADRE Media de <PE-A> IL-1b-PE	Geom. VIVA/CD34+/PROGENITORA Media de <PE-A> IL-1b-PE	Geom. VIVA/CD71+ Media de <PE-A> IL-1b-PE	Geom. VIVA/CD33+ Media de <PE-A> IL-1b-PE
SIN TINCIÓN	1457	25484	45,5	9979
SOLO PLASMA	201	9682	56,6	8884
1 μ g IgG	126	6667	15,5	8051
0,1 μ g IgG de CD33	191	6380	48,2	8472
0,5 μ g IgG de CD33	151	10343	24,4	9073

Tabla 4. El tratamiento con IgG de CD33 disminuye la generación de IL-1β en un espécimen del MDS.				
Tipo de valor de subconjunto de ascendencia para	Geom. VIVA/CD34+/MADRE Media de <PE-A> IL-1b-PE	Geom. VIVA/CD34+/PROGENITORA Media de <PE-A> IL-1b-PE	Geom. VIVA/CD71+ Media de <PE-A> IL-1b-PE	Geom. VIVA/CD33+ Media de <PE-A> IL-1b-PE
1 μ g IgG de CD33	119	3092	12,6	3766

Como se muestra en la Figura 12, el nivel de cambio de la generación de caspasa-1 activa y la IL-1 β normalizada al control tratado con plasma en cuatro poblaciones celulares. La generación de la caspasa-1 activa y la IL-1 β se evaluó en cuatro poblaciones mediante citometría de flujo después del tratamiento con IgG de CD33: células madre (CD34+CD38-), progenitoras (CD34+CD38+), eritroides (CD71+) y células mieloides (CD33+). Nivel de cambio de la generación de IFM de caspasa-1 activa (Fig. 12A) y la IL-1 β (Fig. 12B).

Como se muestra en la Figura 13, el nivel de cambio de la generación de caspasa-1 activa y la IL-1 β normalizada al control tratado con plasma en cuatro poblaciones celulares. La generación de la caspasa-1 activa y la IL-1 β se evaluó en cuatro poblaciones mediante citometría de flujo después del tratamiento con un inhibidor de vía relacionado: células madre (CD34+CD38-), progenitoras (CD34+CD38+), eritroides (CD71+) y células mieloides (CD33+). Nivel de cambio de la generación de IFM de caspasa-1 activa (Fig. 13A) y la IL-1 β (Fig. 13B).

Se evaluó la generación de caspasa-1 e IL-1 β activa en cuatro poblaciones: células madre (CD34+CD38-), progenitoras (CD34+CD38+), eritroides (CD71+) y células mieloides (CD33+). Los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) se encuentran en las Tablas 3 y 4.

Como se muestra en la Figura 14, la neutralización del plasma S100A9 mediante la trampa de quimera CD33 mejora la capacidad de formación de colonias en especímenes de pacientes con MDS. Las Figuras 14A a 14C muestran unidades formadoras de brotes de eritroides (UFB-E) (Fig. 14B), unidades formadoras de colonias multipotenciales (UFC-GEMM) (Fig. 14A) y unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos (UFC-GM) (Fig. 14C) en especímenes de pacientes con MDS tratadas con IgG, plasma o 0,1, 0,5 o 1,0 μ g de trampa quimérica IgG de CD33.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado según lo entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la invención descrita.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute

5 <120> CD33 SOLUBLE PARA TRATAR SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS (MDS)

<130> 10110-061W01

<150> US 61/843.274

10 <151> 05/07/2013

<150> US 61/930.798

<151> 23/01/2014

15 <150> US 61/931.366

<151> 24/01/2014

<150> US 61/978.009

<151> 10/04/2014

20

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1

<211> 242

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 1

ES 2 777 227 T3

Asp	Pro	Asn	Phe	Trp	Leu	Gln	Val	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Val	Gln	Glu	1	5	10	15
Gly	Leu	Cys	Val	Leu	Val	Pro	Cys	Thr	Phe	Phe	His	Pro	Ile	Pro	Tyr	20	25	30	
Tyr	Asp	Lys	Asn	Ser	Pro	Val	His	Gly	Tyr	Trp	Phe	Arg	Glu	Gly	Ala	35	40	45	
Ile	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Lys	Leu	Asp	Gln	Glu	50	55	60	
Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Gln	Gly	Arg	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro	Ser	65	70	75	80
Arg	Asn	Asn	Cys	Ser	Leu	Ser	Ile	Val	Asp	Ala	Arg	Arg	Arg	Asp	Asn	85	90	95	
Gly	Ser	Tyr	Phe	Phe	Arg	Met	Glu	Arg	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ser	Tyr	100	105	110	
Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Ser	Val	His	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	His	Arg	Pro	115	120	125	

Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu
130 135 140

Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe
145 150 155 160

Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His
165 170 175

Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn
180 185 190

Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg
195 200 205

Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr Gly
210 215 220

Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val
225 230 235 240

Val His

<210> 2

<211> 242

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

10 <222> (5)..(5)

<223> Xaa es Trp o Arg

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

15 <222> (52)..(52)

<223> Xaa es Arg o Gly

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

20 <222> (111)..(111)

<223> Xaa es Ser o Asn

<400> 2

ES 2 777 227 T3

Asp Pro Asn Phe Xaa Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu
1 5 10 15

Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro Tyr
20 25 30

ES 2 777 227 T3

Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala
35 40 45

Ile Ile Ser Xaa Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu
50 55 60

Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser
65 70 75 80

Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn
85 90 95

Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Xaa Tyr
100 105 110

Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro
115 120 125

Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu
130 135 140

Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe
145 150 155 160

Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His
165 170 175

Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn
180 185 190

Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg
195 200 205

Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr Gly
210 215 220

Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val
225 230 235 240

Val His

<210> 3

<211> 122

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 777 227 T3

<400> 3

Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu Gly
1 5 10 15

Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro Tyr Tyr
20 25 30

Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala Ile
35 40 45

Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu Val
50 55 60

Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser Arg
65 70 75 80

Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn Gly
85 90 95

Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr Lys
100 105 110

Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp
115 120

5

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (4)..(4)

<223> Xaa es Trp o Arg

15

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (51)..(51)

<223> Xaa es Arg o Gly

20

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_DIVERSA

<222> (110)..(110)

<223> Xaa es Ser o Asn

25

<400> 4

ES 2 777 227 T3

Pro Asn Phe Xaa Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu Gly
1 5 10 15

Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro Tyr Tyr
20 25 30

Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala Ile
35 40 45

Ile Ser Xaa Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu Val
50 55 60

Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser Arg
65 70 75 80

Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn Gly
85 90 95

Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Xaa Tyr Lys
100 105 110

Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp
115 120

5 <210> 5
<211> 608
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 5

ES 2 777 227 T3

Glu	Ser	Trp	Glu	Pro	Cys	Val	Glu	Val	Val	Pro	Asn	Ile	Thr	Tyr	Gln	1	5	10	15
Cys	Met	Glu	Leu	Asn	Phe	Tyr	Lys	Ile	Pro	Asp	Asn	Leu	Pro	Phe	Ser	20	25	30	
Thr	Lys	Asn	Leu	Asp	Leu	Ser	Phe	Asn	Pro	Leu	Arg	His	Leu	Gly	Ser	35	40	45	
Tyr	Ser	Phe	Phe	Ser	Phe	Pro	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Arg	50	55	60	
Cys	Glu	Ile	Gln	Thr	Ile	Glu	Asp	Gly	Ala	Tyr	Gln	Ser	Leu	Ser	His	65	70	75	80
Leu	Ser	Thr	Leu	Ile	Leu	Thr	Gly	Asn	Pro	Ile	Gln	Ser	Leu	Ala	Leu	85	90	95	
Gly	Ala	Phe	Ser	Gly	Leu	Ser	Ser	Leu	Gln	Lys	Leu	Val	Ala	Val	Glu	100	105	110	
Thr	Asn	Leu	Ala	Ser	Leu	Glu	Asn	Phe	Pro	Ile	Gly	His	Leu	Lys	Thr	115	120	125	

ES 2 777 227 T3

Leu Lys Glu Leu Asn Val Ala His Asn Leu Ile Gln Ser Phe Lys Leu
130 135 140

Pro Glu Tyr Phe Ser Asn Leu Thr Asn Leu Glu His Leu Asp Leu Ser
145 150 155 160

Ser Asn Lys Ile Gln Ser Ile Tyr Cys Thr Asp Leu Arg Val Leu His
165 170 175

Gln Met Pro Leu Leu Asn Leu Ser Leu Asp Leu Ser Leu Asn Pro Met
180 185 190

Asn Phe Ile Gln Pro Gly Ala Phe Lys Glu Ile Arg Leu His Lys Leu
195 200 205

Thr Leu Arg Asn Asn Phe Asp Ser Leu Asn Val Met Lys Thr Cys Ile
210 215 220

Gln Gly Leu Ala Gly Leu Glu Val His Arg Leu Val Leu Gly Glu Phe
225 230 235 240

Arg Asn Glu Gly Asn Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ser Ala Leu Glu Gly
245 250 255

Leu Cys Asn Leu Thr Ile Glu Glu Phe Arg Leu Ala Tyr Leu Asp Tyr
260 265 270

Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Asp Leu Phe Asn Cys Leu Thr Asn Val Ser
275 280 285

Ser Phe Ser Leu Val Ser Val Thr Ile Glu Arg Val Lys Asp Phe Ser
290 295 300

Tyr Asn Phe Gly Trp Gln His Leu Glu Leu Val Asn Cys Lys Phe Gly
305 310 315 320

Gln Phe Pro Thr Leu Lys Leu Lys Ser Leu Lys Arg Leu Thr Phe Thr
325 330 335

Ser Asn Lys Gly Gly Asn Ala Phe Ser Glu Val Asp Leu Pro Ser Leu
340 345 350

Glu Phe Leu Asp Leu Ser Arg Asn Gly Leu Ser Phe Lys Gly Cys Cys
355 360 365

Ser Gln Ser Asp Phe Gly Thr Thr Ser Leu Lys Tyr Leu Asp Leu Ser
370 375 380

ES 2 777 227 T3

Phe Asn Gly Val Ile Thr Met Ser Ser Asn Phe Leu Gly Leu Glu Gln
385 390 395 400

Leu Glu His Leu Asp Phe Gln His Ser Asn Leu Lys Gln Met Ser Glu
405 410 415

Phe Ser Val Phe Leu Ser Leu Arg Asn Leu Ile Tyr Leu Asp Ile Ser
420 425 430

His Thr His Thr Arg Val Ala Phe Asn Gly Ile Phe Asn Gly Leu Ser
435 440 445

Ser Leu Glu Val Leu Lys Met Ala Gly Asn Ser Phe Gln Glu Asn Phe
450 455 460

Leu Pro Asp Ile Phe Thr Glu Leu Arg Asn Leu Thr Phe Leu Asp Leu
465 470 475 480

Ser Gln Cys Gln Leu Glu Gln Leu Ser Pro Thr Ala Phe Asn Ser Leu
485 490 495

Ser Ser Leu Gln Val Leu Asn Met Ser His Asn Asn Phe Phe Ser Leu
500 505 510

Asp Thr Phe Pro Tyr Lys Cys Leu Asn Ser Leu Gln Val Leu Asp Tyr
515 520 525

Ser Leu Asn His Ile Met Thr Ser Lys Lys Gln Glu Leu Gln His Phe
530 535 540

Pro Ser Ser Leu Ala Phe Leu Asn Leu Thr Gln Asn Asp Phe Ala Cys
545 550 555 560

Thr Cys Glu His Gln Ser Phe Leu Gln Trp Ile Lys Asp Gln Arg Gln
565 570 575

Leu Leu Val Glu Val Glu Arg Met Glu Cys Ala Thr Pro Ser Asp Lys
580 585 590

Gln Gly Met Pro Val Leu Ser Leu Asn Ile Thr Cys Gln Met Asn Lys
595 600 605

<210> 6

<211> 320
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 6

ES 2 777 227 T3

Ala	Gln	Asn	Ile	Thr	Ala	Arg	Ile	Gly	Glu	Pro	Leu	Val	Leu	Lys	Cys	
1				5					10					15		
Lys	Gly	Ala	Pro	Lys	Lys	Pro	Pro	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Lys	Leu	Asn	
			20					25					30			
Thr	Gly	Arg	Thr	Glu	Ala	Trp	Lys	Val	Leu	Ser	Pro	Gln	Gly	Gly	Gly	
		35					40					45				
Pro	Trp	Asp	Ser	Val	Ala	Arg	Val	Leu	Pro	Asn	Gly	Ser	Leu	Phe	Leu	
	50					55					60					
Pro	Ala	Val	Gly	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Ile	Phe	Arg	Cys	Gln	Ala	Met	
65					70					75					80	
Asn	Arg	Asn	Gly	Lys	Glu	Thr	Lys	Ser	Asn	Tyr	Arg	Val	Arg	Val	Tyr	
				85					90					95		
Gln	Ile	Pro	Gly	Lys	Pro	Glu	Ile	Val	Asp	Ser	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	
			100					105					110			
Ala	Gly	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Gly	Thr	Cys	Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Tyr	
		115					120					125				
Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Ser	Trp	His	Leu	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Val	Pro	
	130					135					140					
Asn	Glu	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Lys	Glu	Gln	Thr	Arg	Arg	His	Pro	Glu	
145					150					155					160	
Thr	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Met	Val	Thr	Pro	Ala	Arg	
				165					170					175		
Gly	Gly	Asp	Pro	Arg	Pro	Thr	Phe	Ser	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Gly	Leu	
			180					185					190			
Pro	Arg	His	Arg	Ala	Leu	Arg	Thr	Ala	Pro	Ile	Gln	Pro	Arg	Val	Trp	
		195					200					205				
Glu	Pro	Val	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Val	Glu	Pro	Glu	Gly	
	210					215					220					
Gly	Ala	Val	Ala	Pro	Gly	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Pro	
225					230					235					240	
Ala	Gln	Pro	Ser	Pro	Gln	Ile	His	Trp	Met	Lys	Asp	Gly	Val	Pro	Leu	
				245					250					255		

Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu Pro Glu Ile Gly Pro Gln
260 265 270

Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr His Ser Ser His Gly Pro
275 280 285

Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile Ile Glu Pro Gly Glu Glu
290 295 300

Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser Gly Leu Gly Thr Leu Ala
305 310 315 320

<210> 7

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 7

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
1 5 10 15

15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 8

25

Asp Ile Glu Gly Arg Met Asp
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión recombinante quimérica, que comprende:
 - 5 (a) una combinación de al menos dos fracciones de unión a S100A9 seleccionados de entre el grupo que consiste en un dominio extracelular de CD33 humano, un dominio extracelular de receptor tipo toll 4 (TLR4) y un dominio extracelular de receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE); y
 - (b) una región Fc de inmunoglobulina.
- 10 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, que comprende una fórmula seleccionada de entre el grupo que consiste en:
 - 15 eCD33 - eTLR4 - Fc,
 - eCD33 - eRAGE - Fc,
 - eTLR4 - eRAGE - Fc,
 - eRAGE - eTLR4 - Fc,
 - eCD33 - eTLR4 - eRAGE - Fc,
 - eCD33 - eRAGE - eTLR4 - Fc,
 - eTLR4 - eCD33 - eRAGE - Fc,
 - 20 eRAGE - eCD33 - eTLR4 - Fc,
 - eTLR4 - eRAGE - eCD33 - Fc, y
 - eRAGE - eTLR4 - eCD33 - Fc,
- donde "eCD33" comprende el dominio extracelular de CD33 humano,
- 25 donde "eTLR4" comprende el dominio extracelular de TLR4,
- donde "eRAGE" comprende el dominio extracelular de RAGE,
- donde "Fc" comprende la región Fc de inmunoglobulina, y
- donde "-" consiste en un ligador peptídico o un enlace peptídico.
- 30 3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, que comprende además un péptido aceptor de biotina que puede biotinilarse con biotina ligasa (BirA) en presencia de biotina y ATP.
4. La proteína de fusión de la reivindicación 3, donde el péptido aceptor de biotina comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:7 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 90% de identidad con la
- 35 SEQ ID NO:7.
5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el dominio extracelular del CD33 humano comprende solo la región variable.
- 40 6. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el dominio extracelular del CD33 humano comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, preferentemente donde el dominio extracelular de CD33 humano comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.
- 45 7. La proteína de fusión de la reivindicación 5, donde la región variable de CD33 humano comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3, o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos el 90% de identidad con la SEQ ID NO:3, preferentemente donde la región variable de CD33 humano comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4.
- 50 8. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el dominio extracelular de TLR4 humano comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO:5.
9. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el dominio extracelular de RAGE
- 55 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6 o una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 90% de identidad con la SEQ ID NO:6.
10. Un complejo multimérico que comprende dos o más proteínas de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 conjugadas con una molécula o partícula central.
- 60 11. El complejo multimérico de la reivindicación 10, donde la molécula central es estreptavidina, y donde las dos o más proteínas de fusión están biotiniladas.

12. El complejo multimérico de la reivindicación 10, donde la molécula central es un liposoma que comprende anticuerpos que se unen específicamente a las dos o más proteínas de fusión, preferentemente donde los anticuerpos se unen específicamente al péptido aceptor de biotina.

5

13. El complejo multimérico de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende de 2 a 5 proteínas de fusión conjugadas con la molécula o partícula central.

14. La proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el complejo multimérico de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección provocada o exacerbada por la actividad de S100A9, que comprende administrar una composición que comprenda dicha proteína de fusión o complejo multimérico a un sujeto que lo necesite.

10

15. La proteína de fusión o complejo multimérico para uso de la reivindicación 14, donde el uso comprende tratar una infección, sepsis o una combinación de las mismas, una enfermedad autoinmune, artritis reumatoide, un cáncer o un síndrome mielodisplásico (MDS) en el sujeto.

15

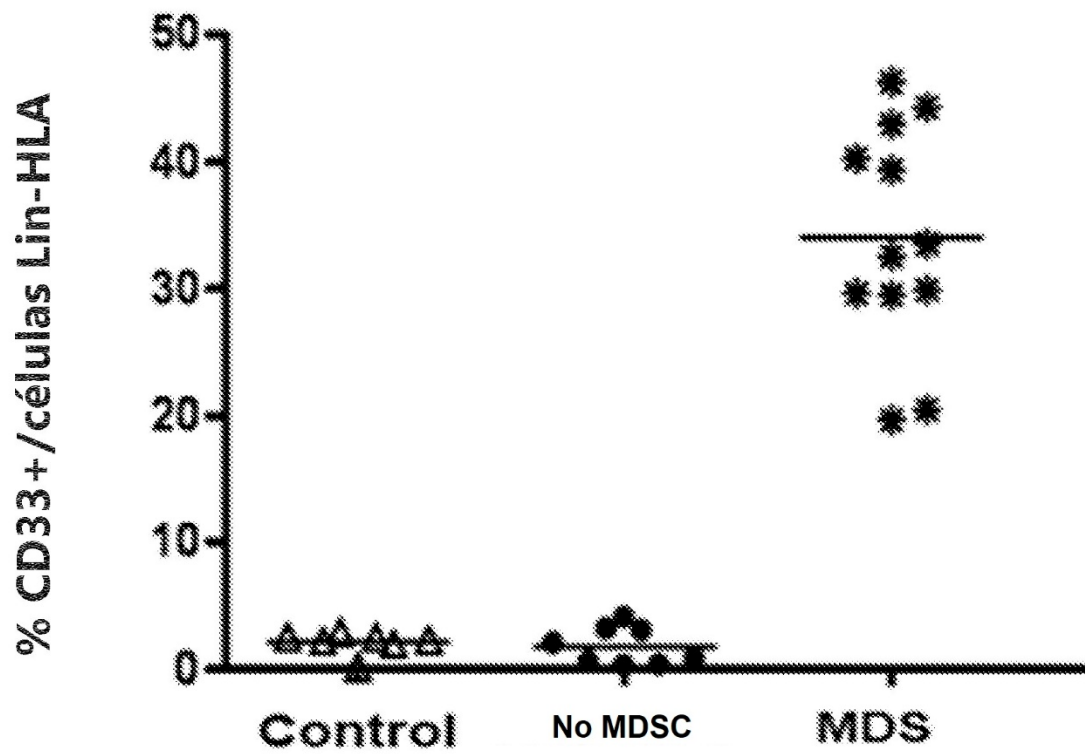
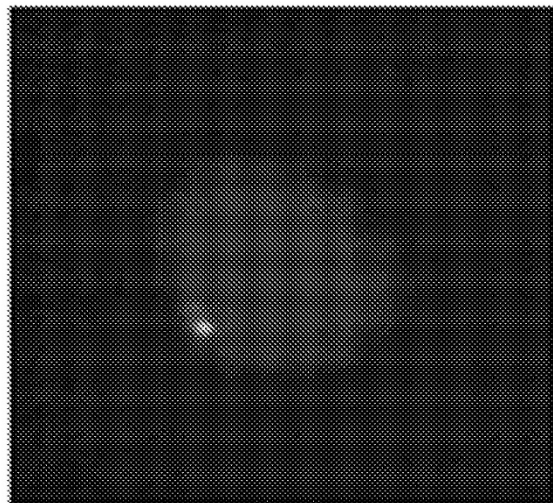


FIGURA 1A



MDS-MDSC



MDS

FIGURA 1B

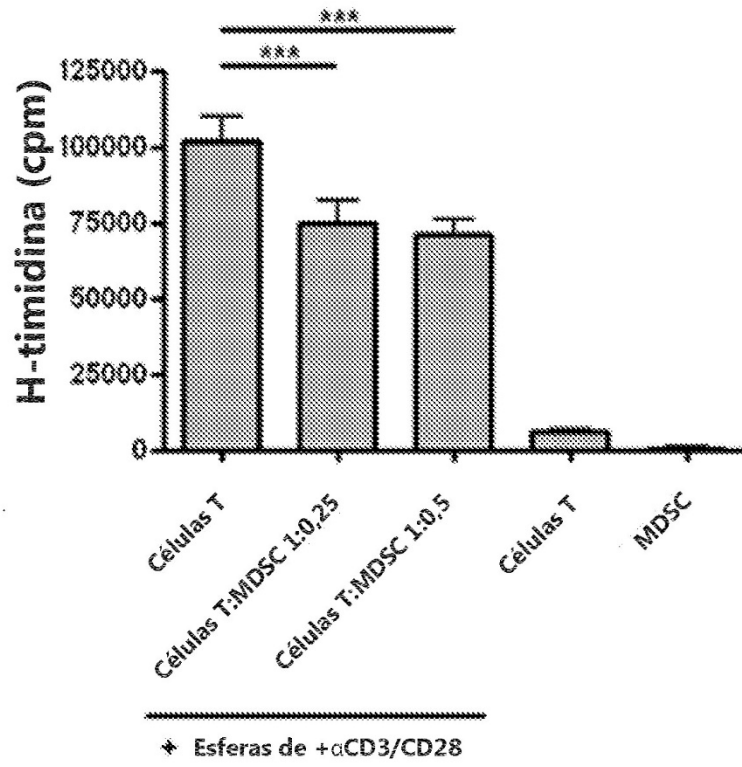


FIGURA 1C

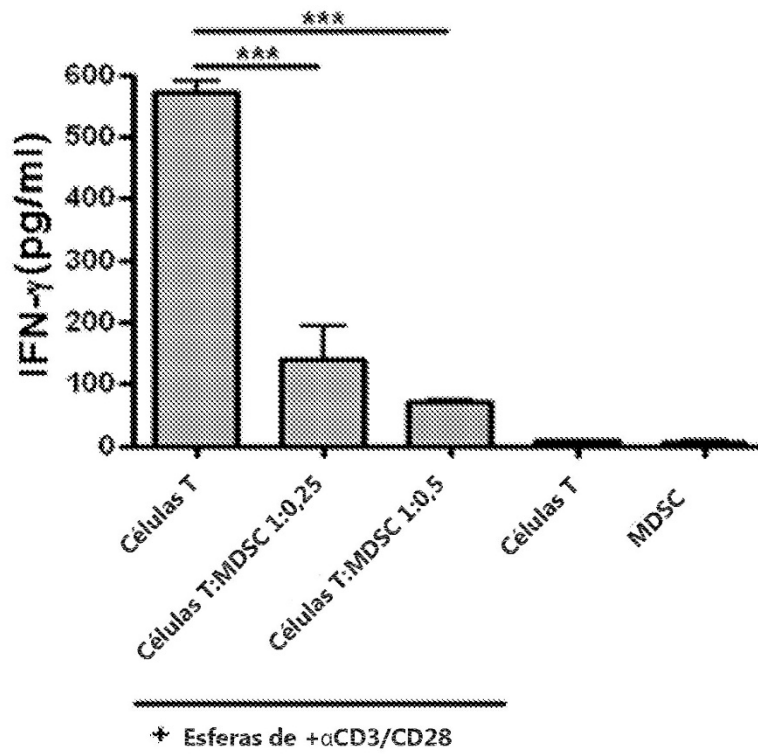


FIGURA 1D

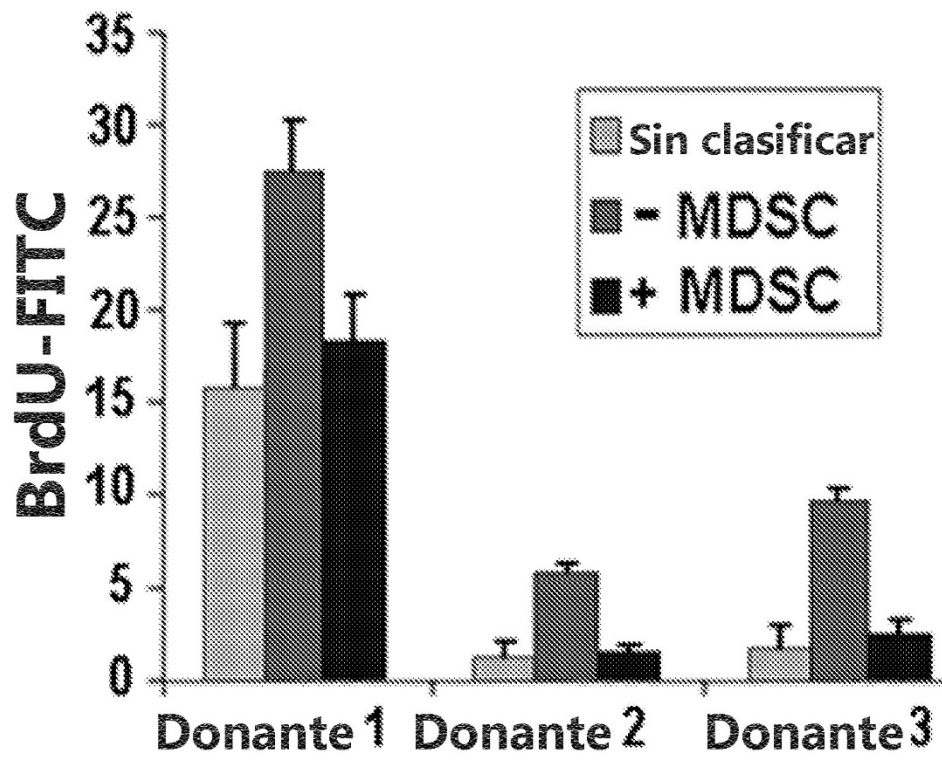
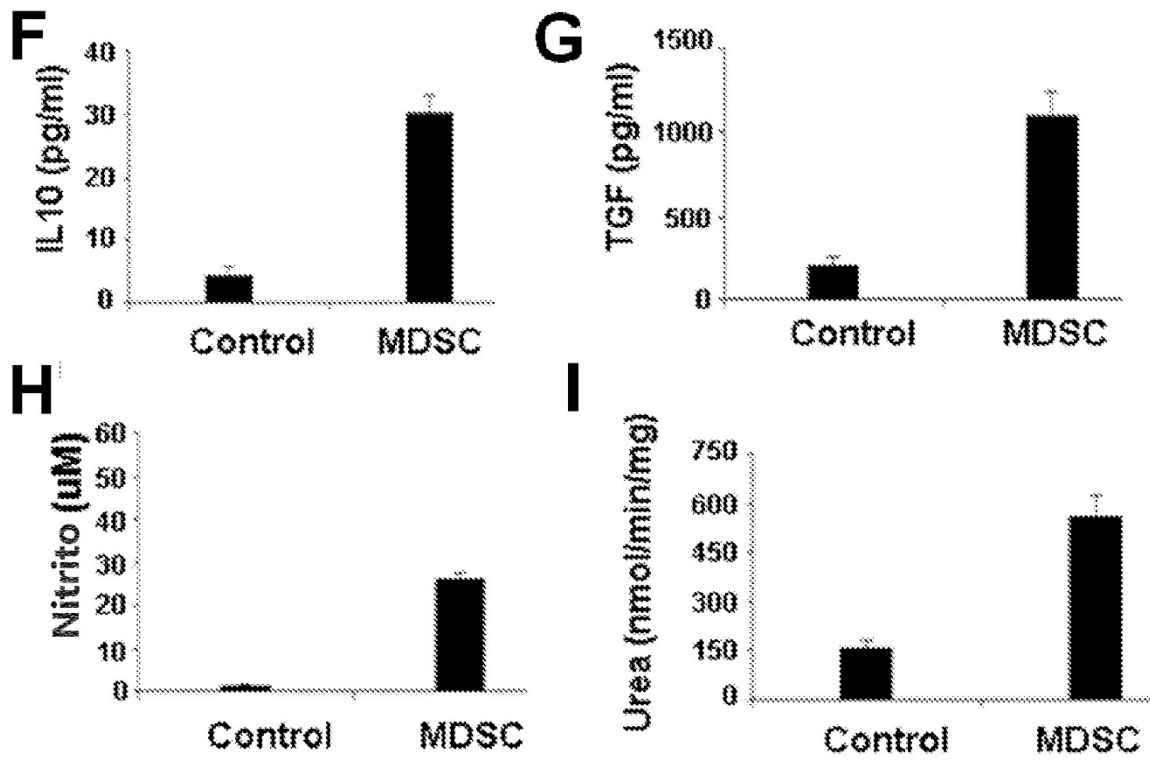


FIGURA 1E



FIGURAS 1F – 1I

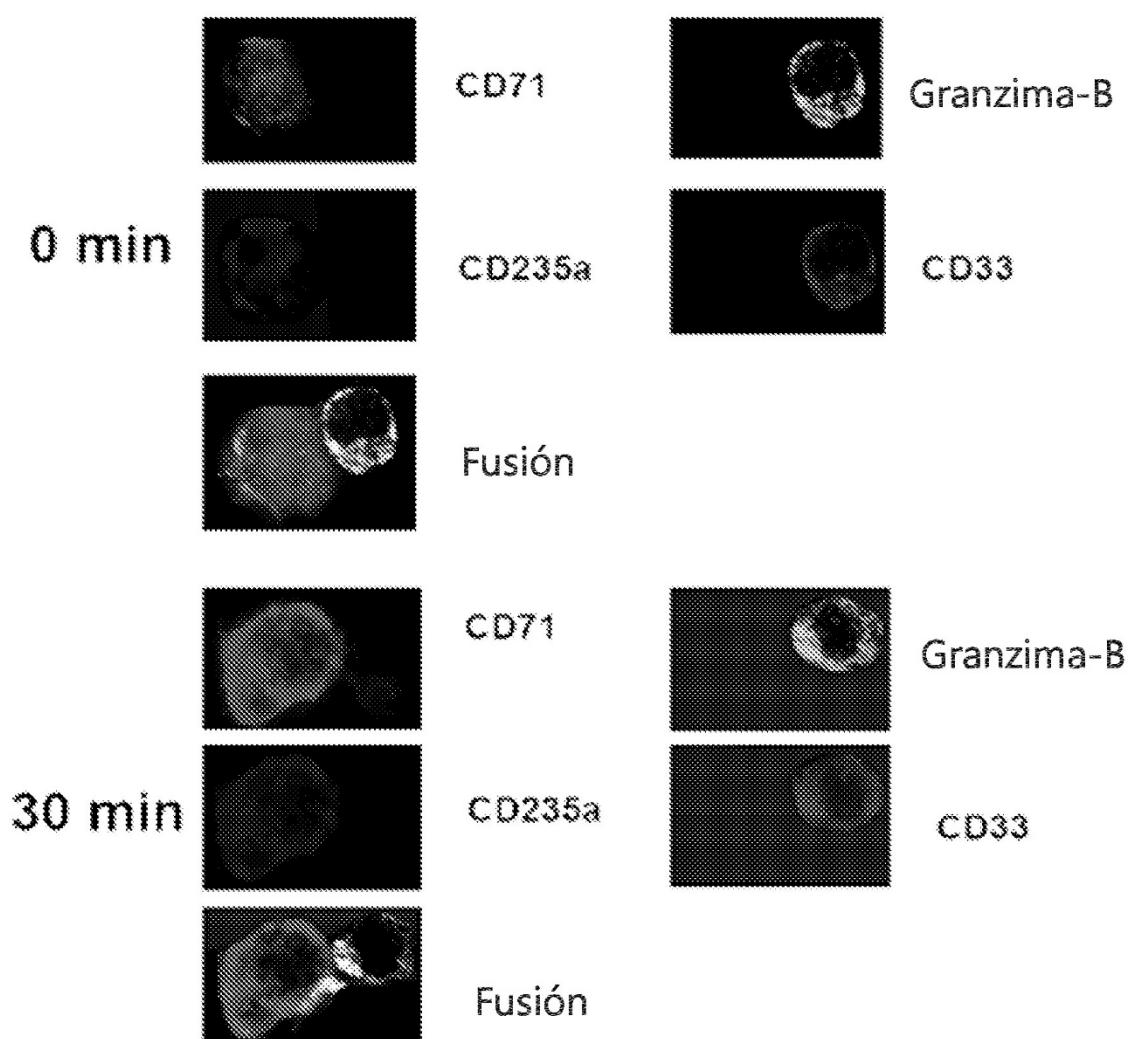


FIGURA 1J

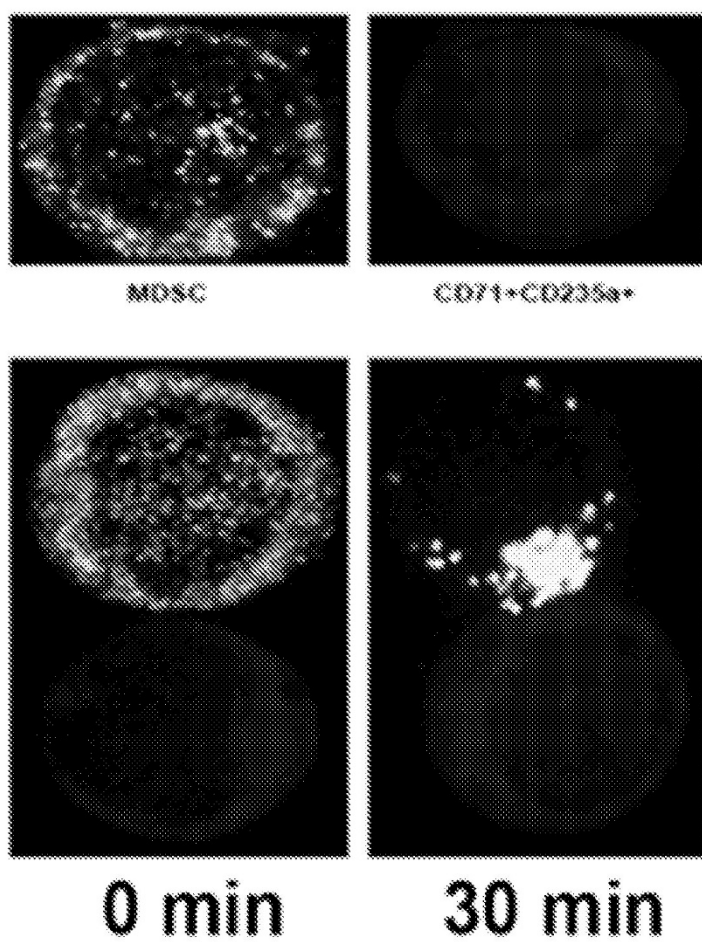


FIGURA 1K

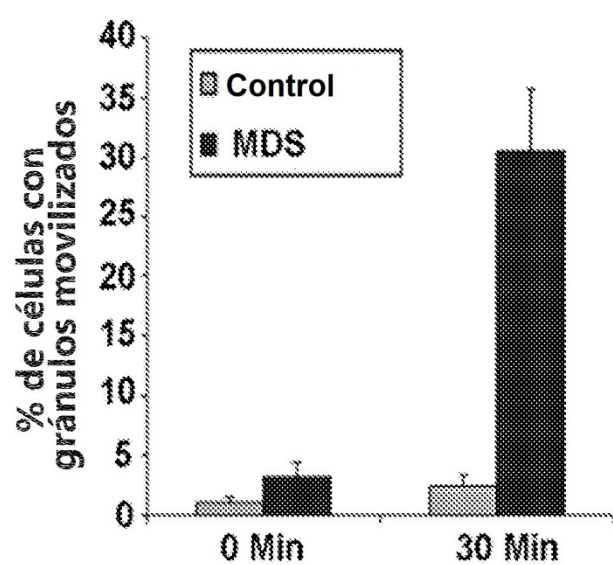


FIGURA 1L

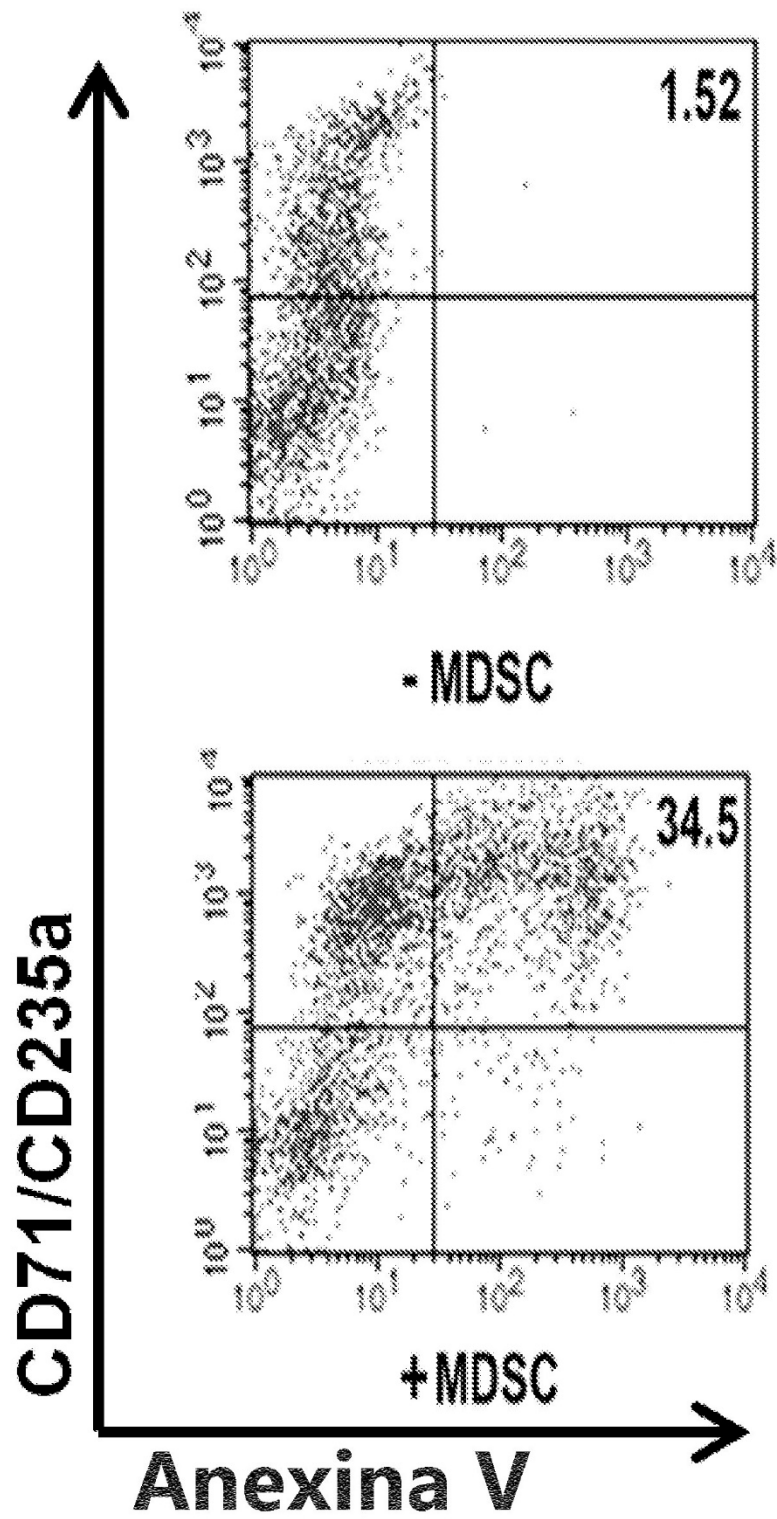


FIGURA 1M

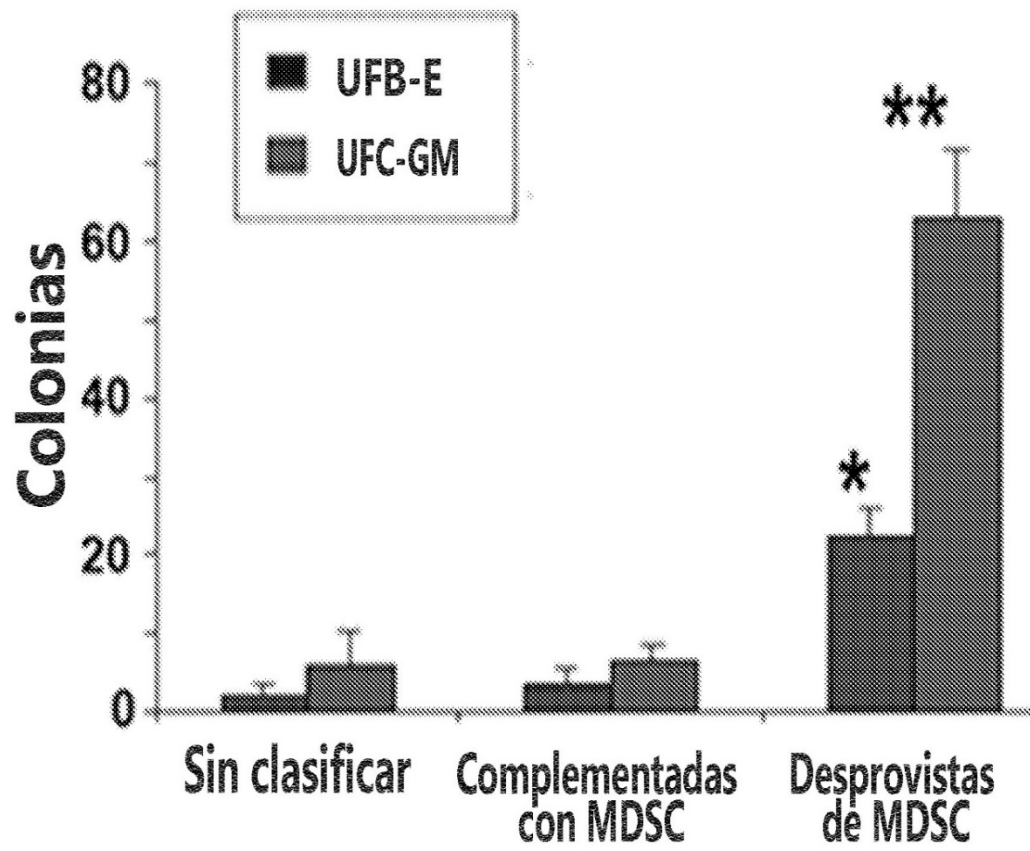


FIGURA 1N

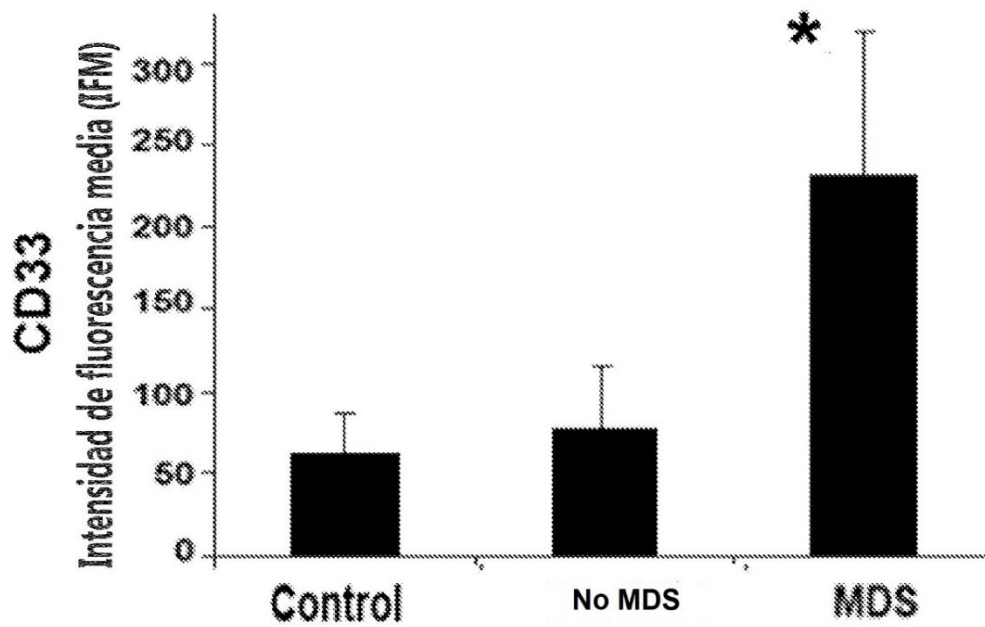


FIGURA 2A

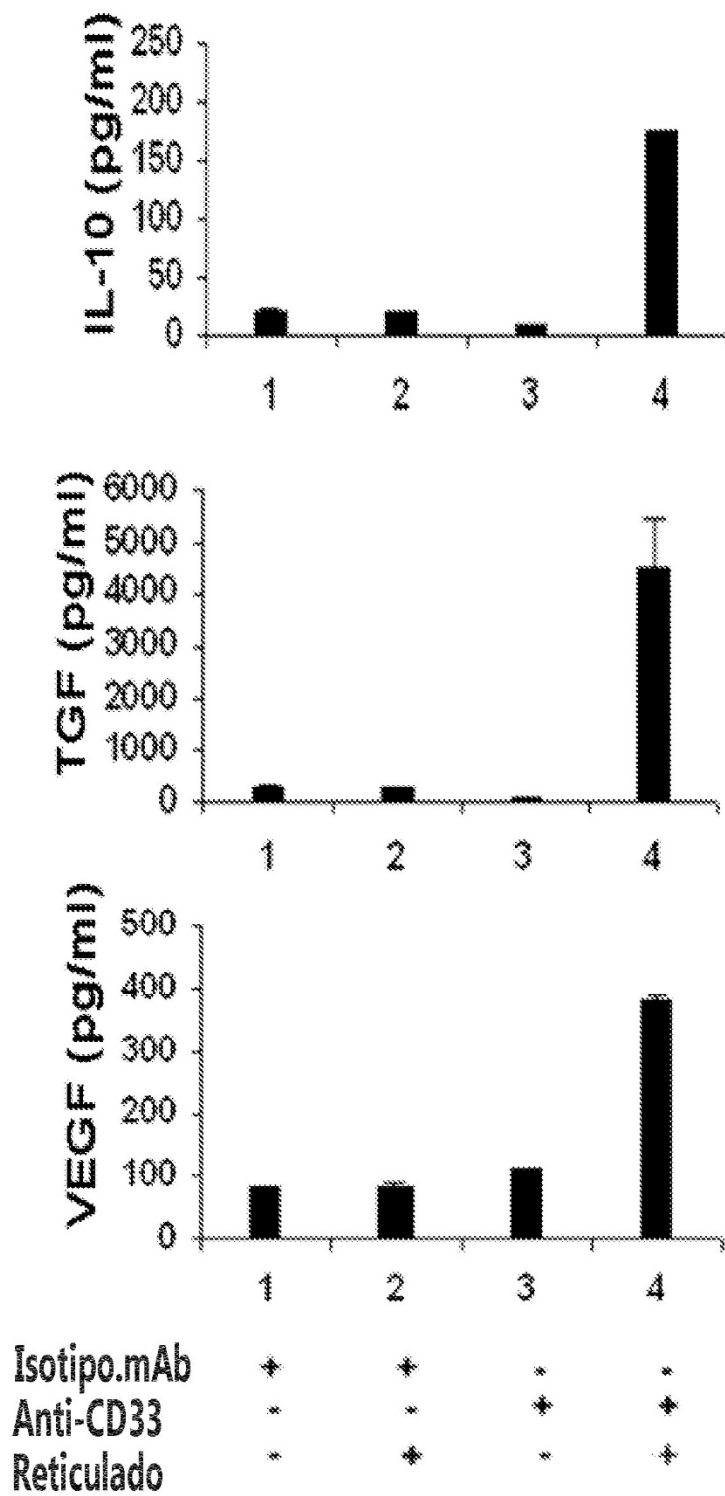


FIGURA 2B

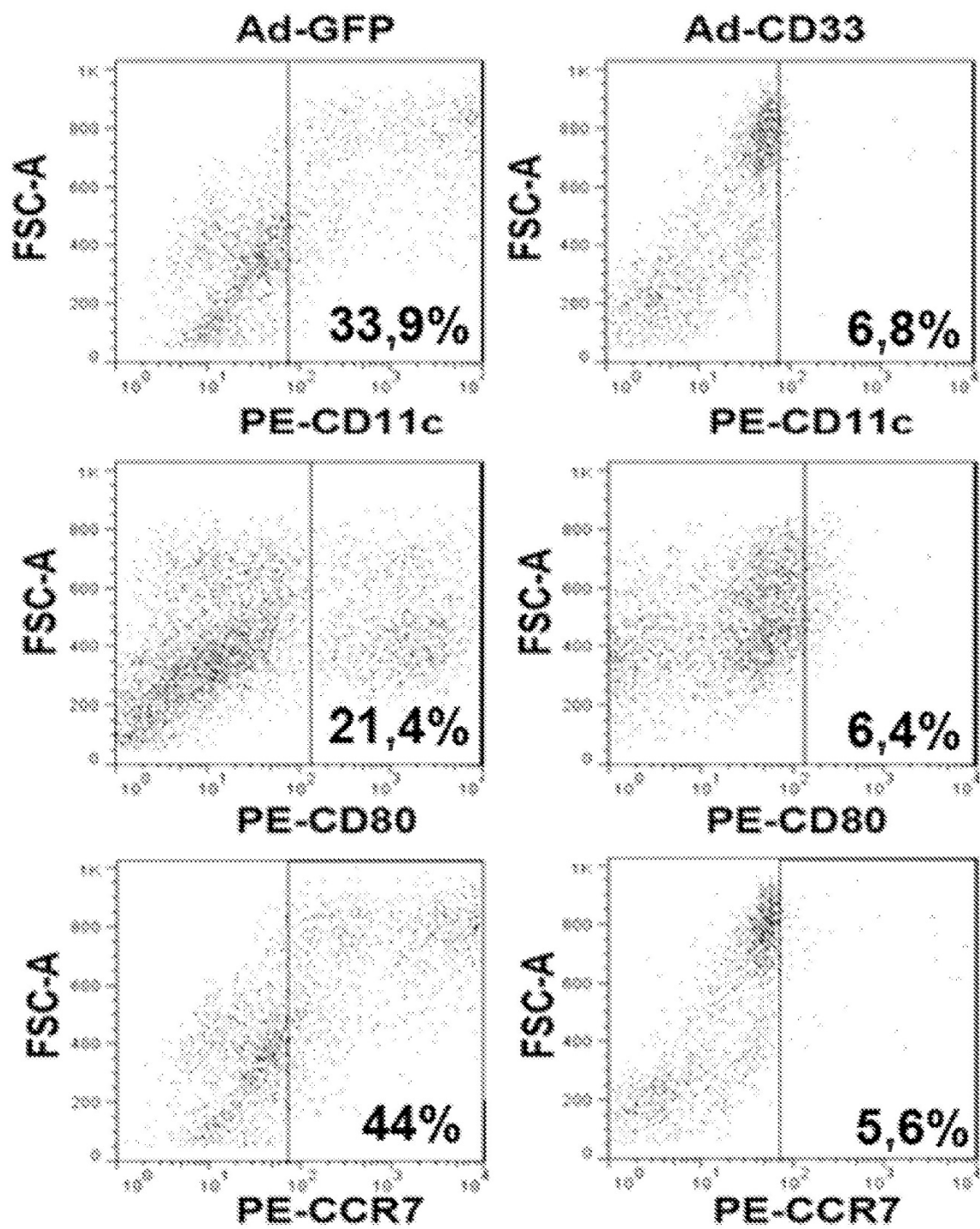


FIGURA 2C

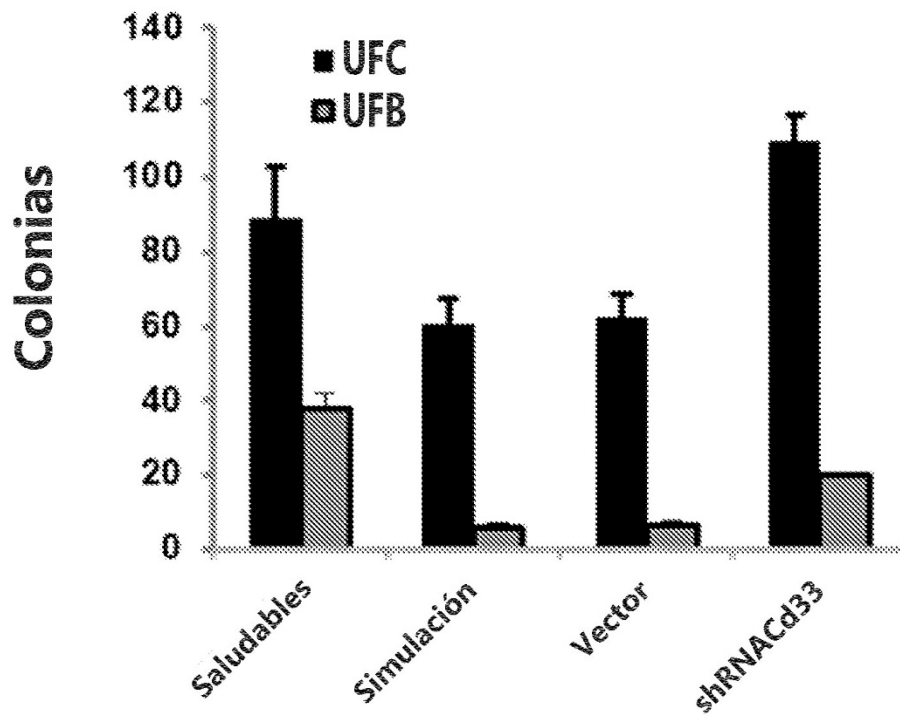


FIGURA 2D

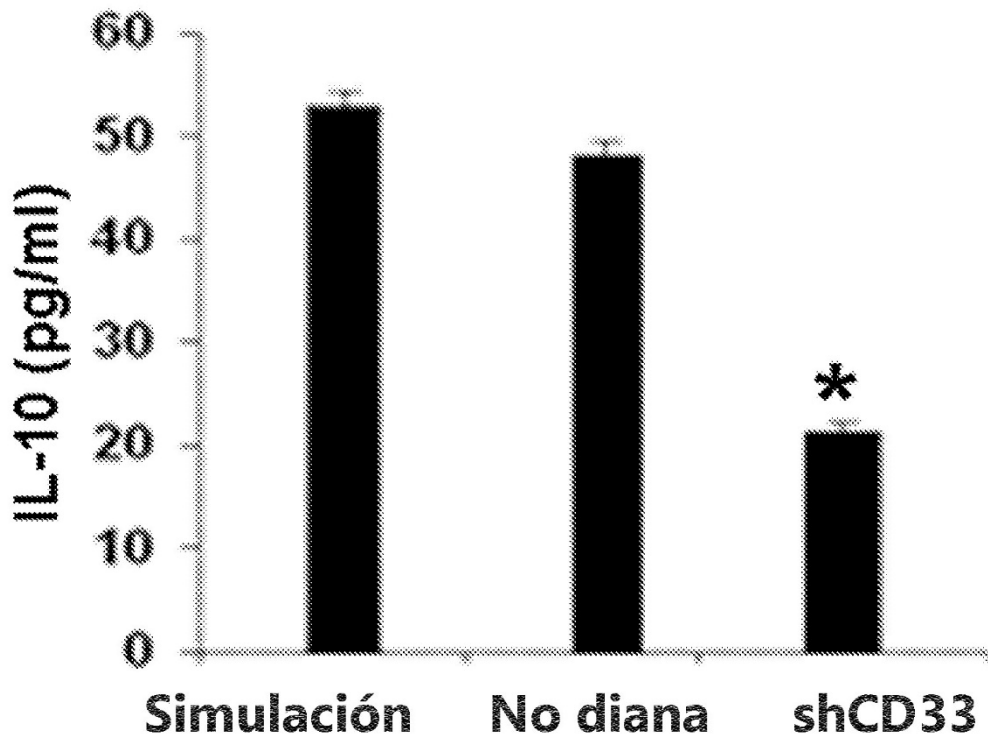


FIGURA 2E

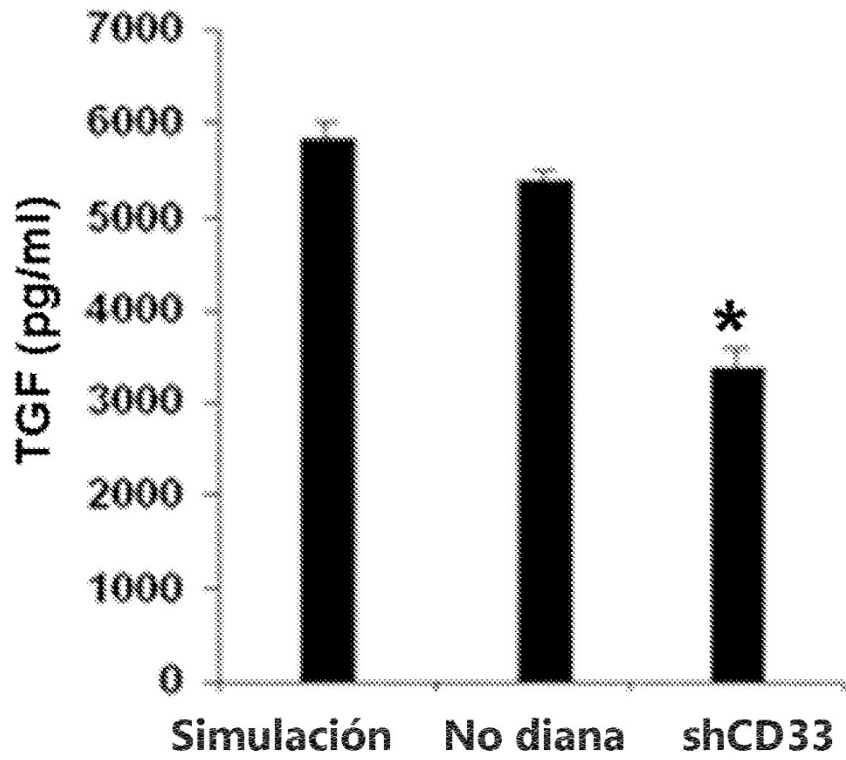


FIGURA 2F

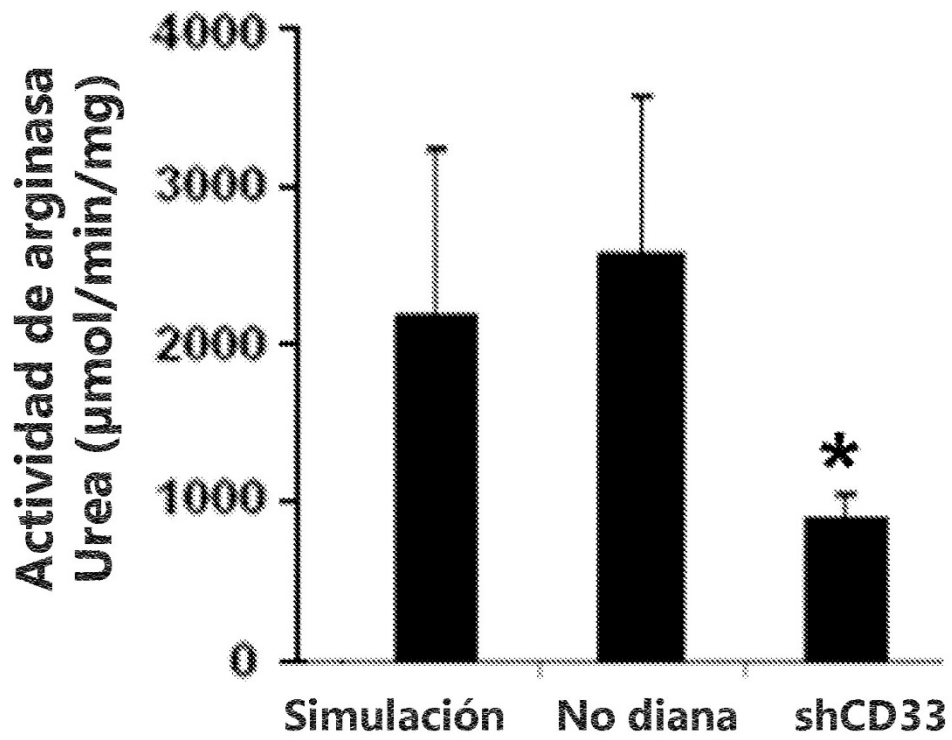


FIGURA 2G

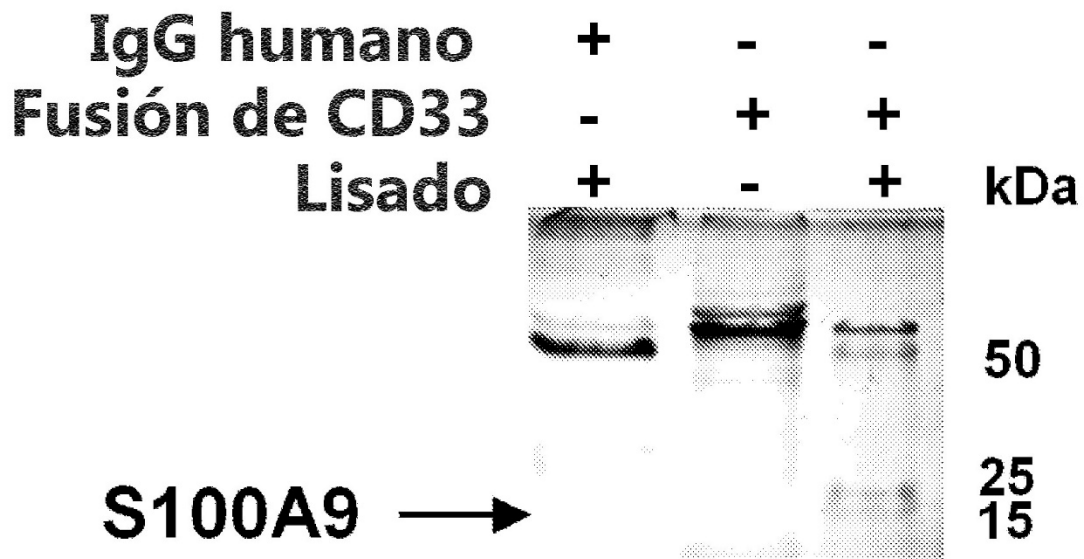


FIGURA 3A

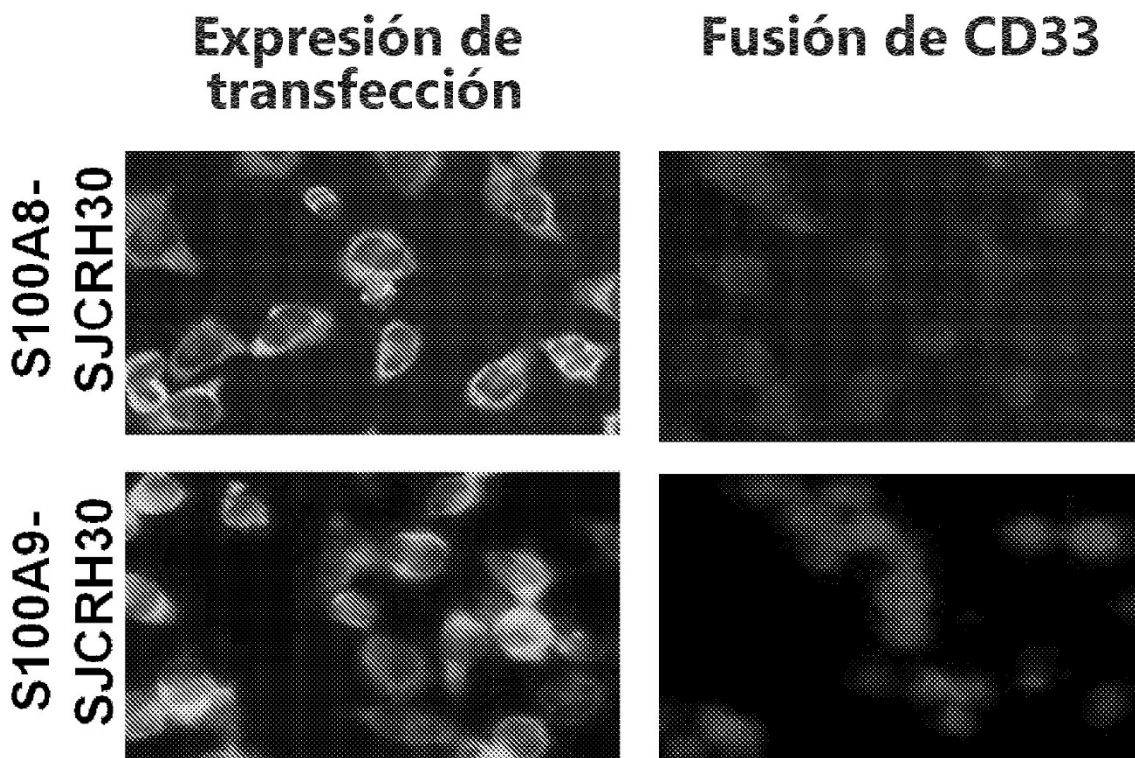


FIGURA 3B

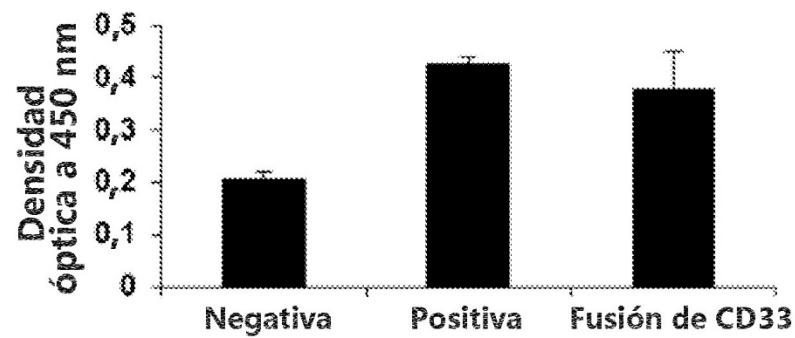


FIGURA 3C

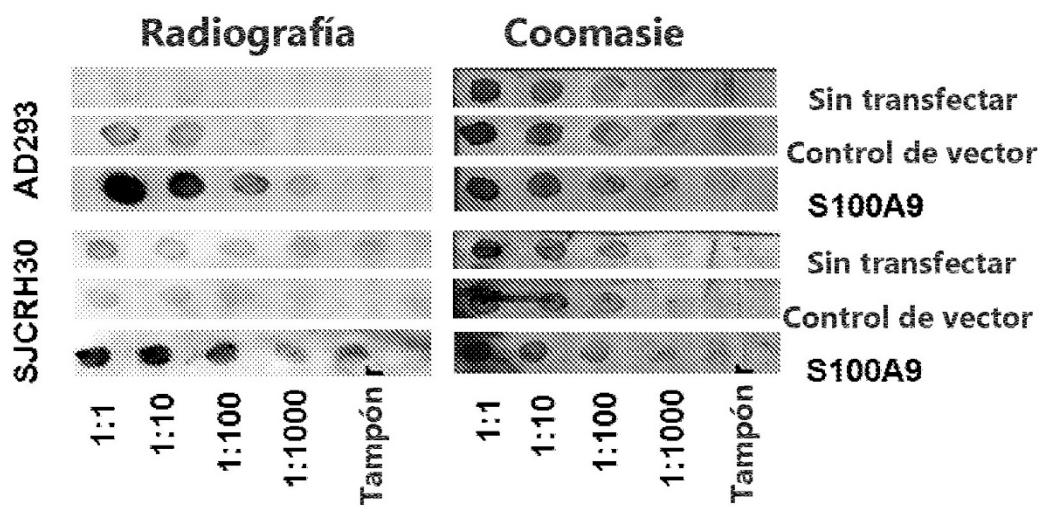
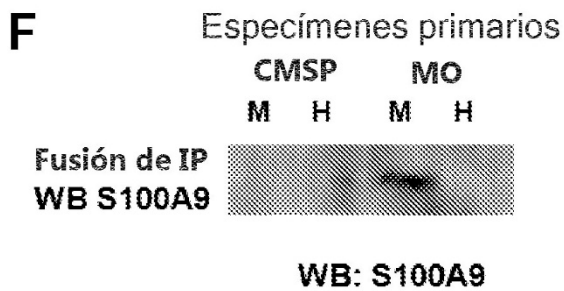
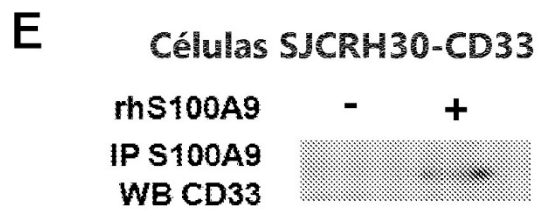


FIGURA 3D



FIGURAS 3E – 3F

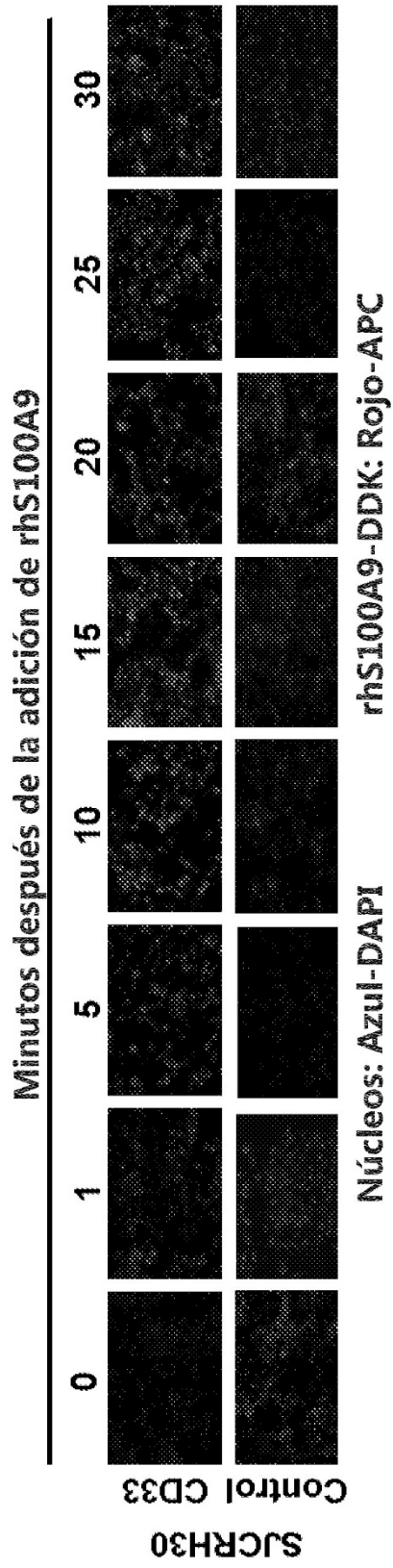


FIGURA 3G

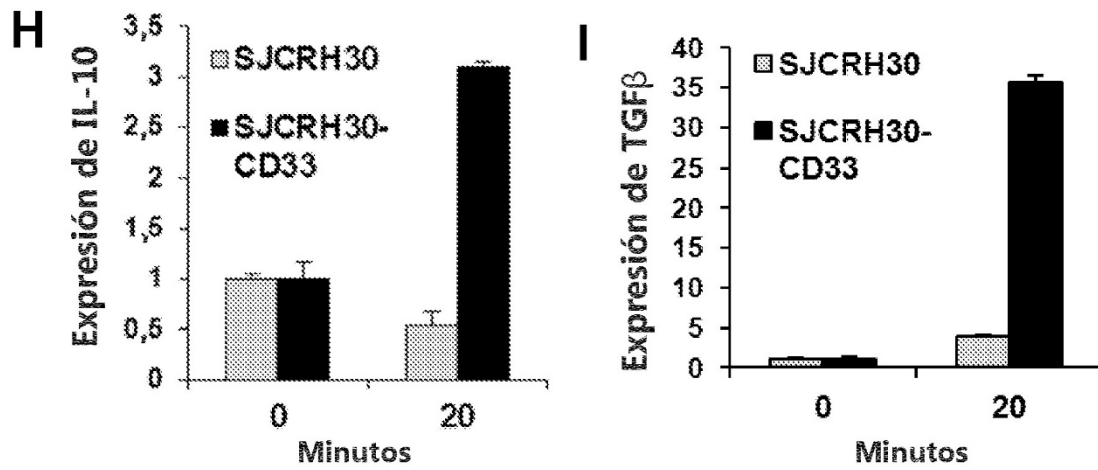


FIGURA 3H – 3I

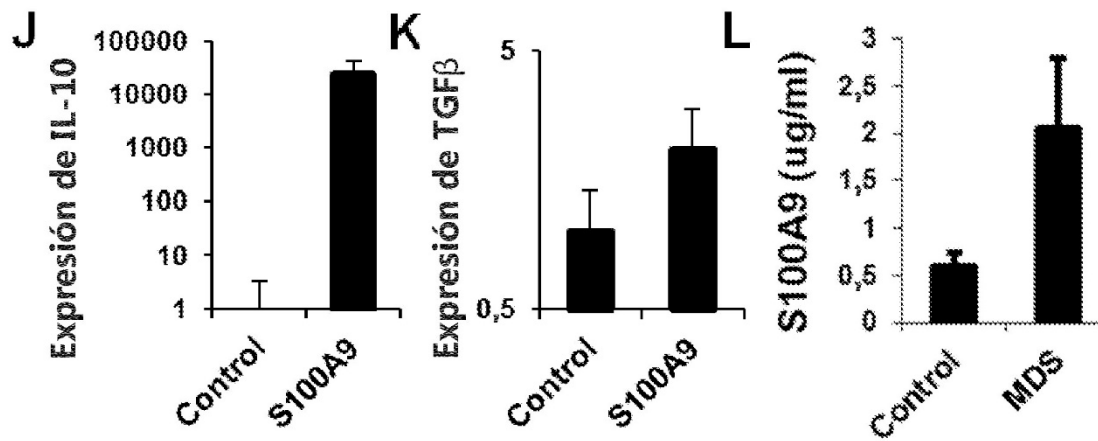


FIGURA 3J – 3L

1 μg de rhS100A9

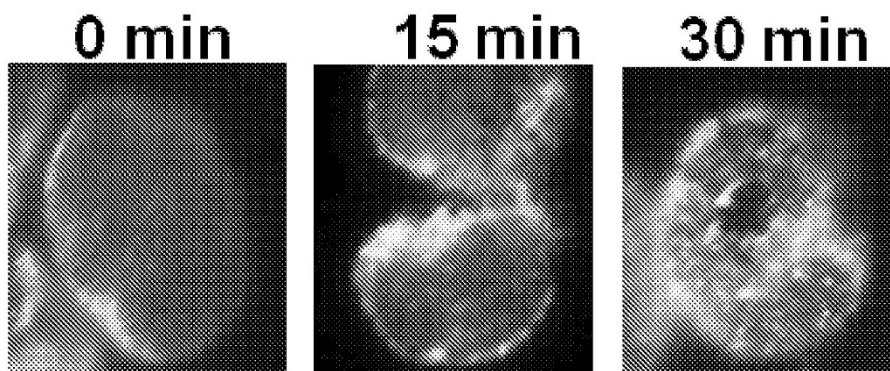


FIGURA 3M

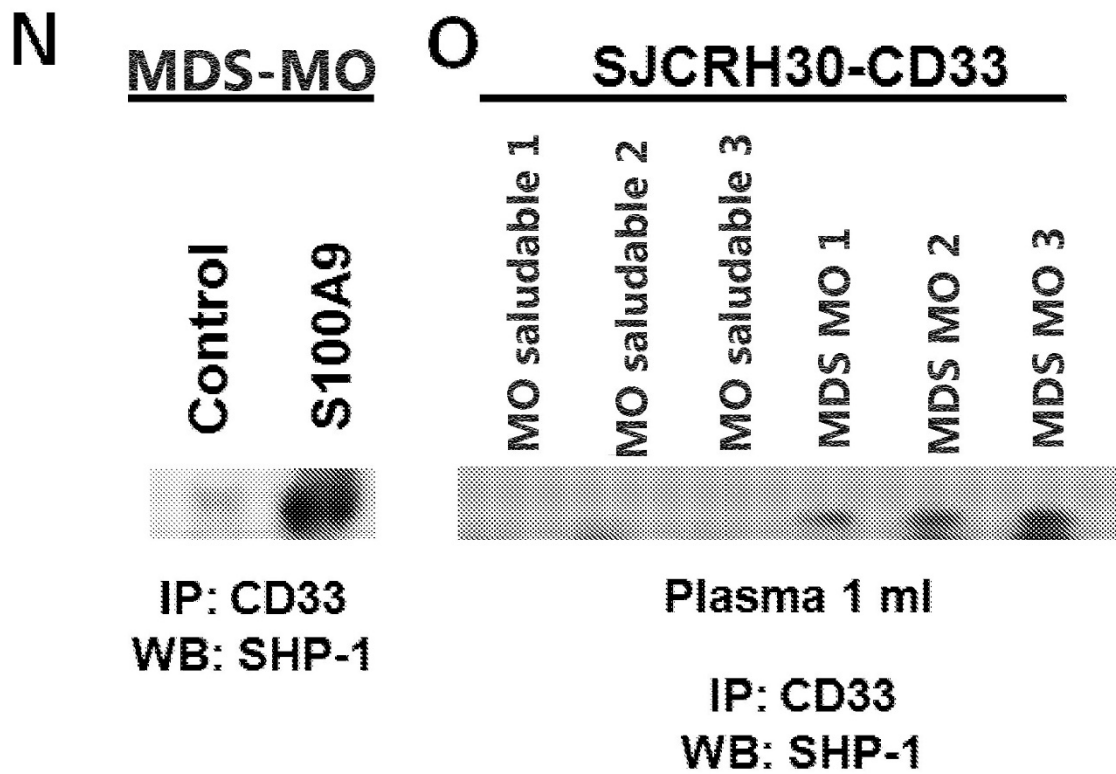


FIGURA 3N – 3O

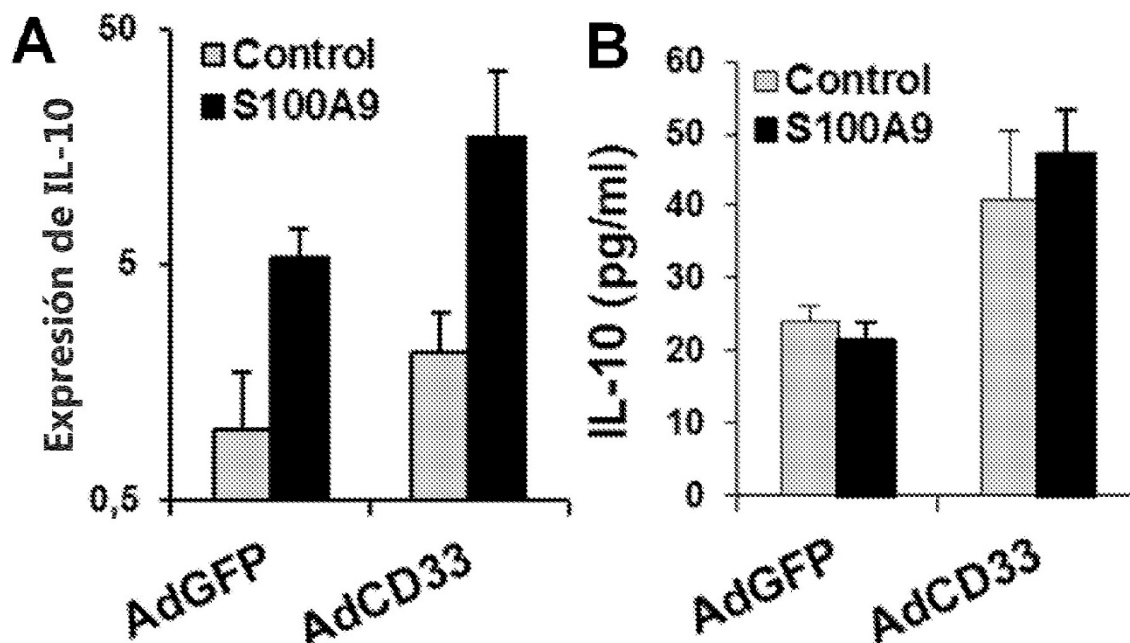


FIGURA 4A – 4B

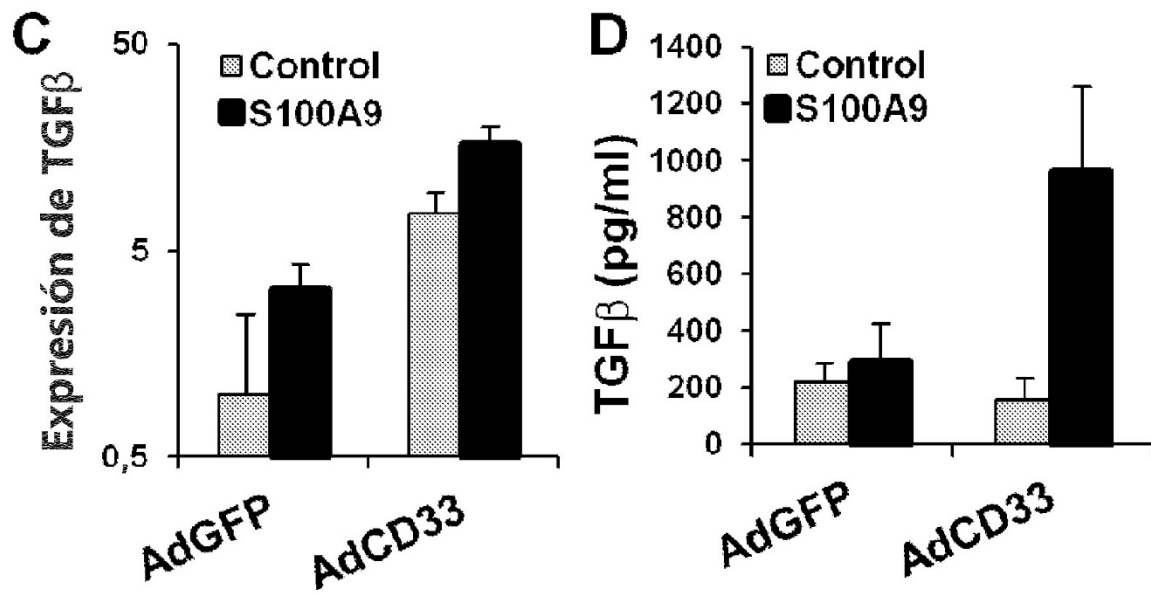


FIGURA 4C – 4D

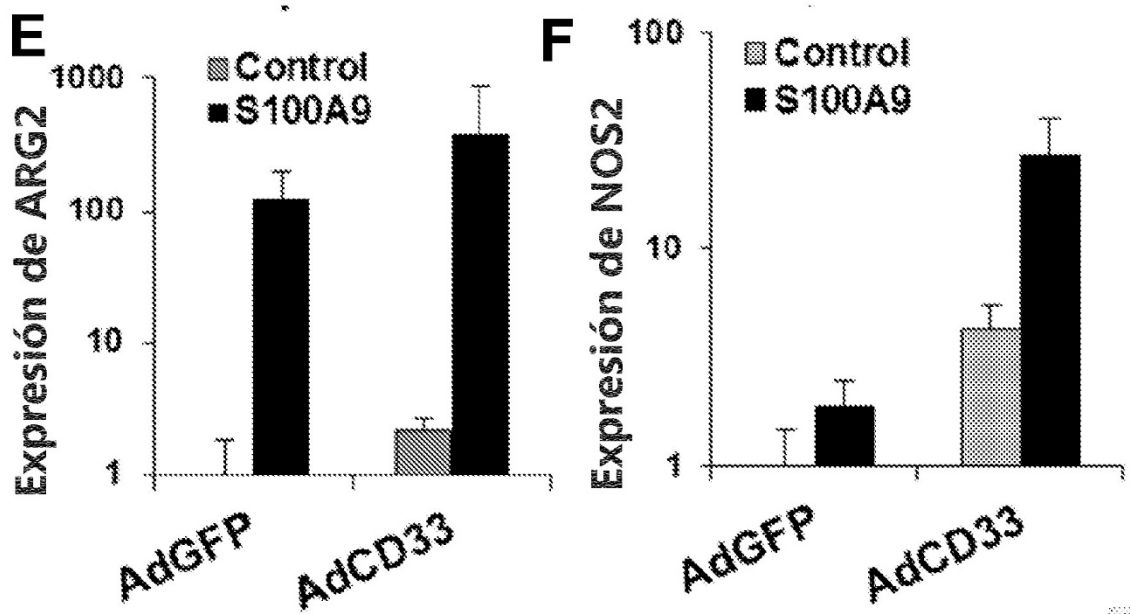


FIGURA 4E – 4F

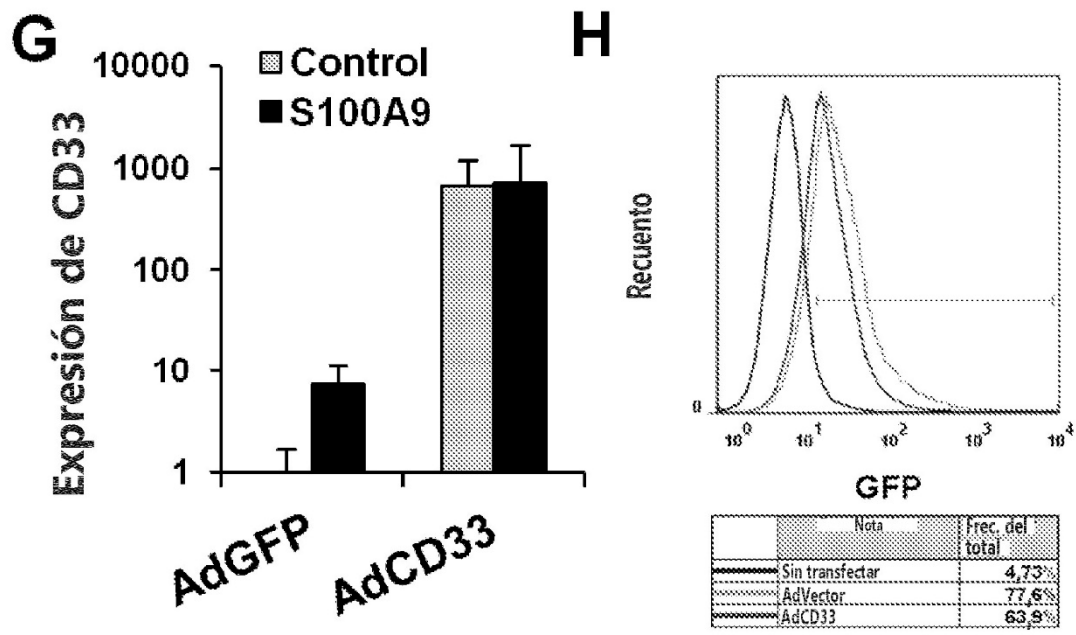


FIGURA 4G – 4H

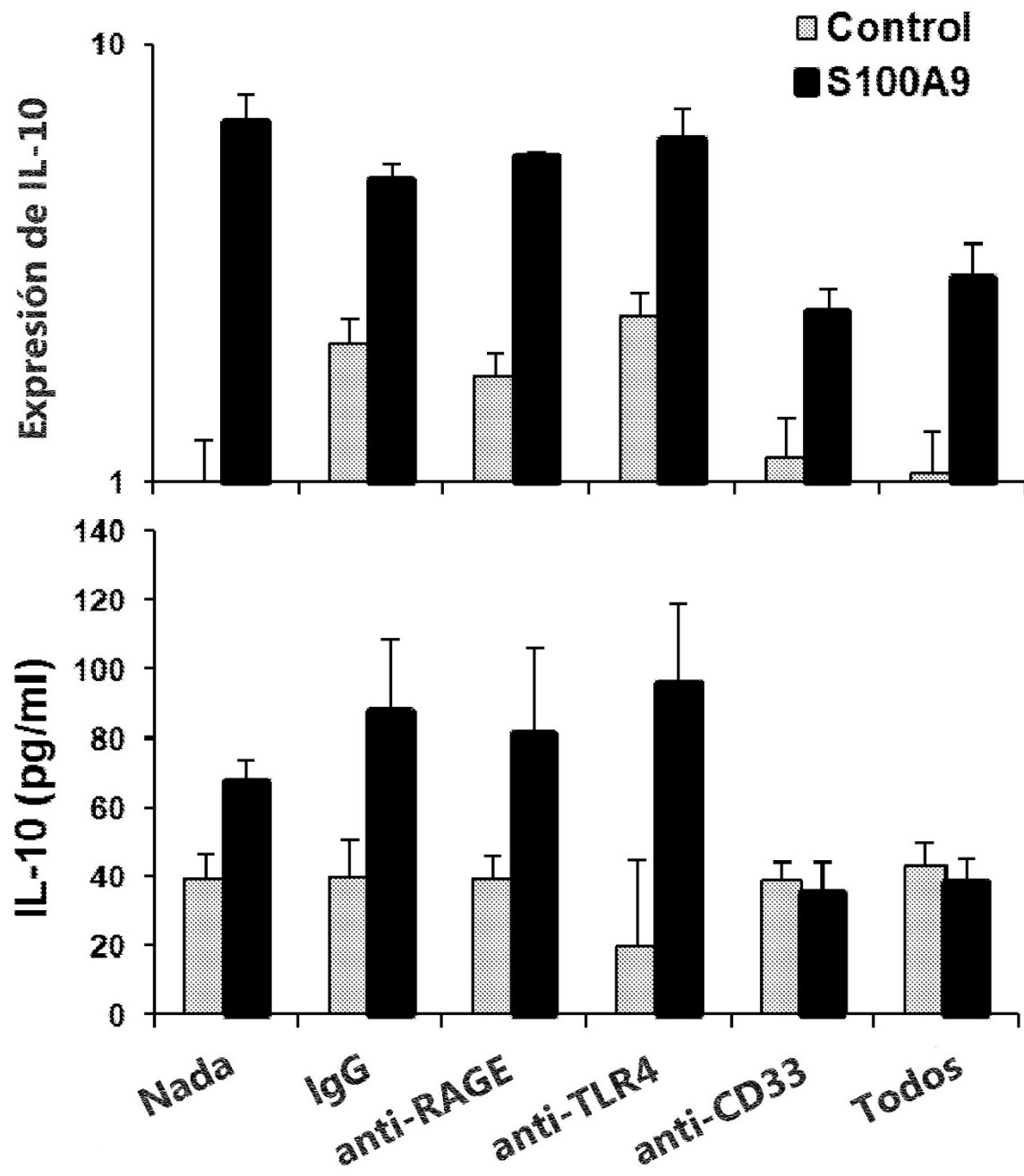


FIGURA 4I

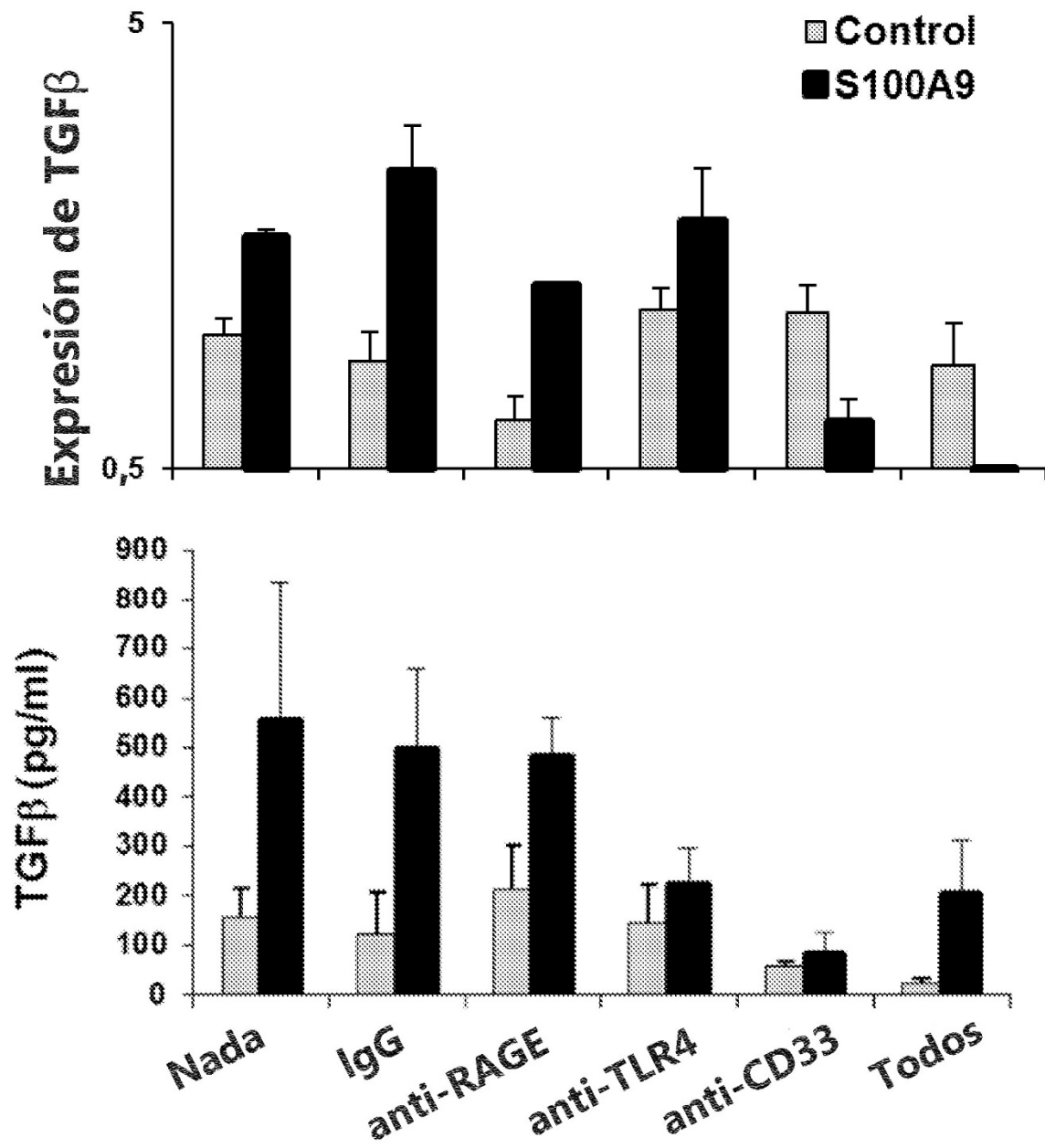


FIGURA 4J

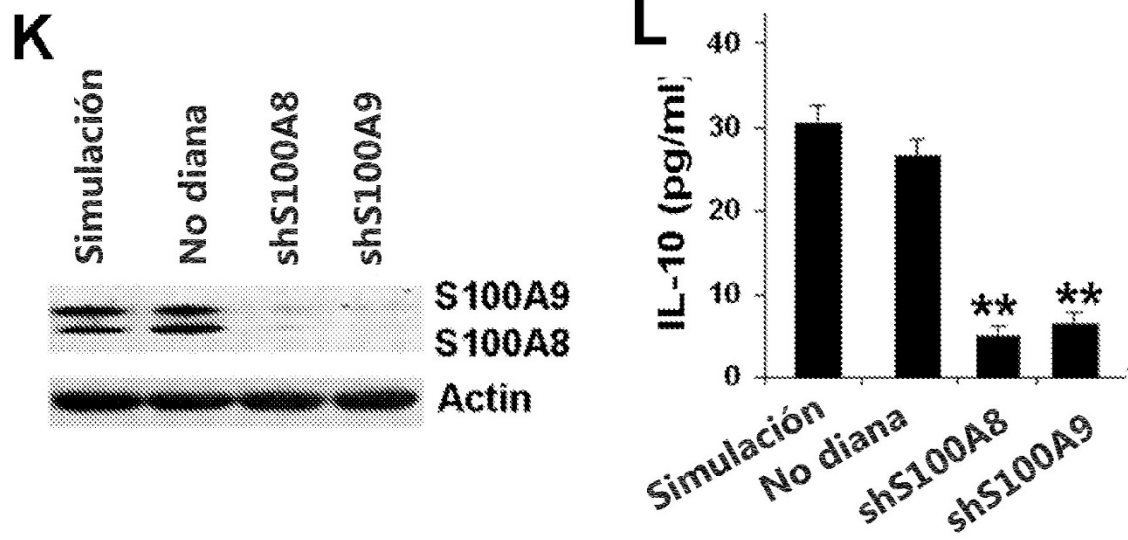


FIGURA 4K – 4L

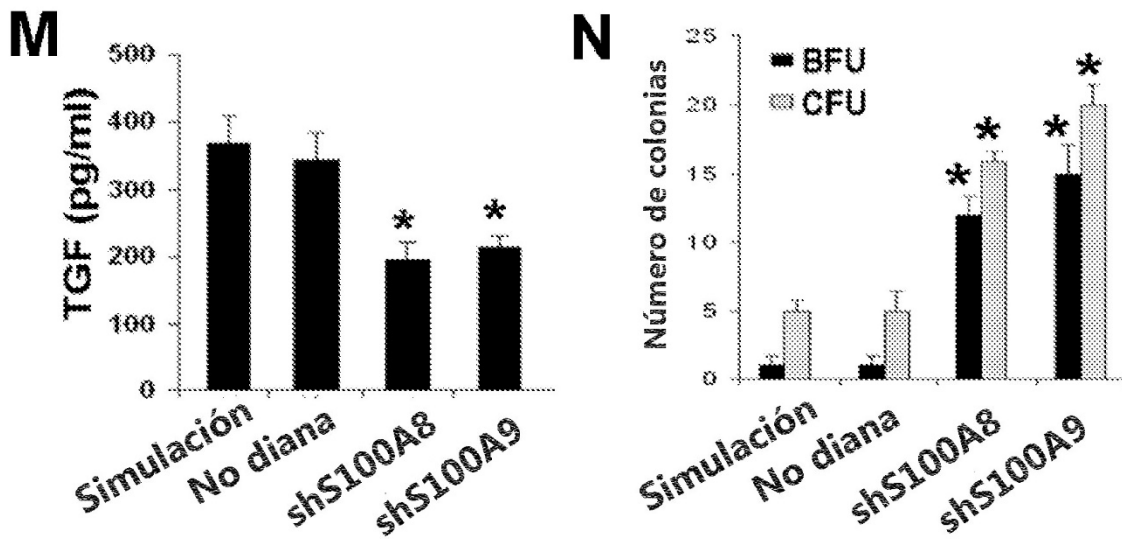


FIGURA 4M – 4N

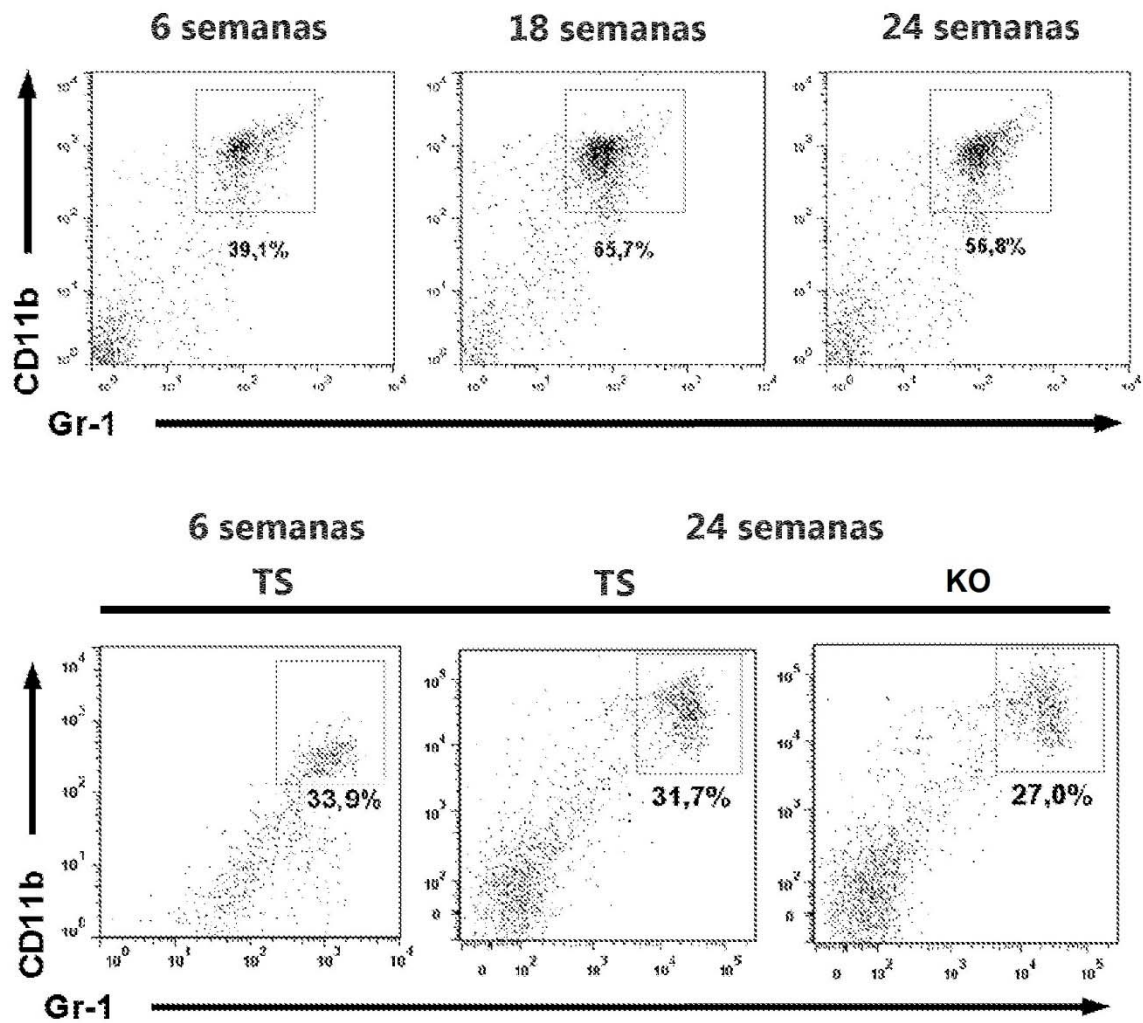


FIGURA 5A

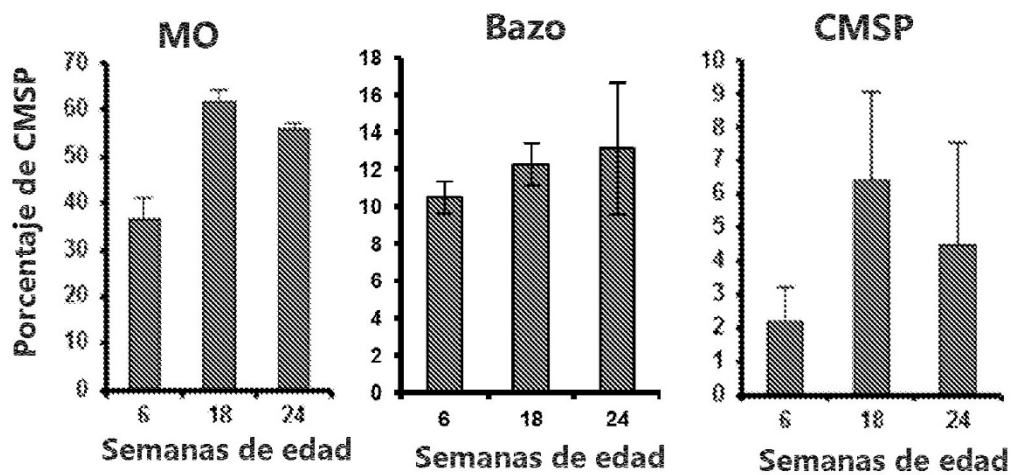


FIGURA 5B

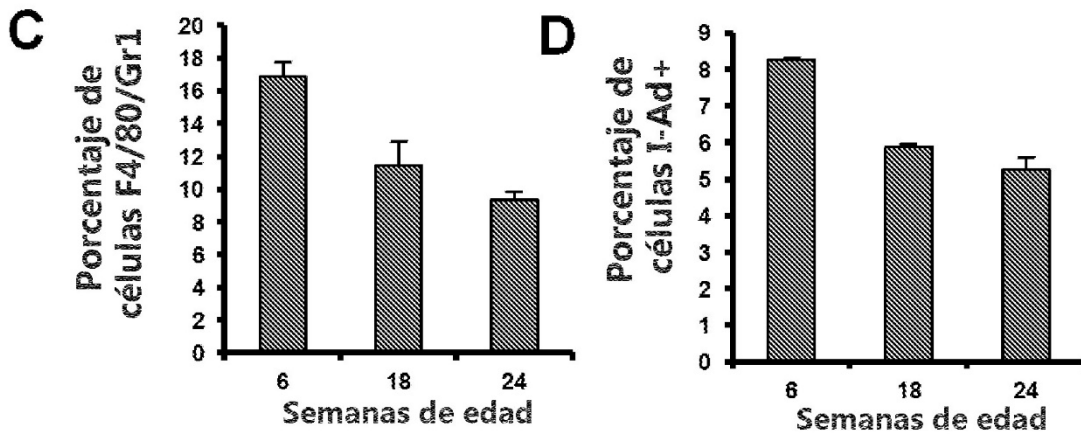


FIGURA 5C – 5D

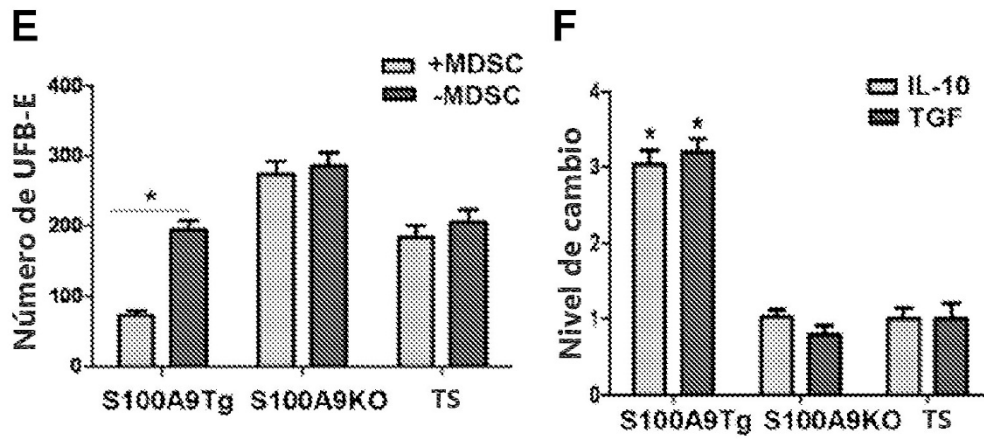


FIGURA 5E – 5F

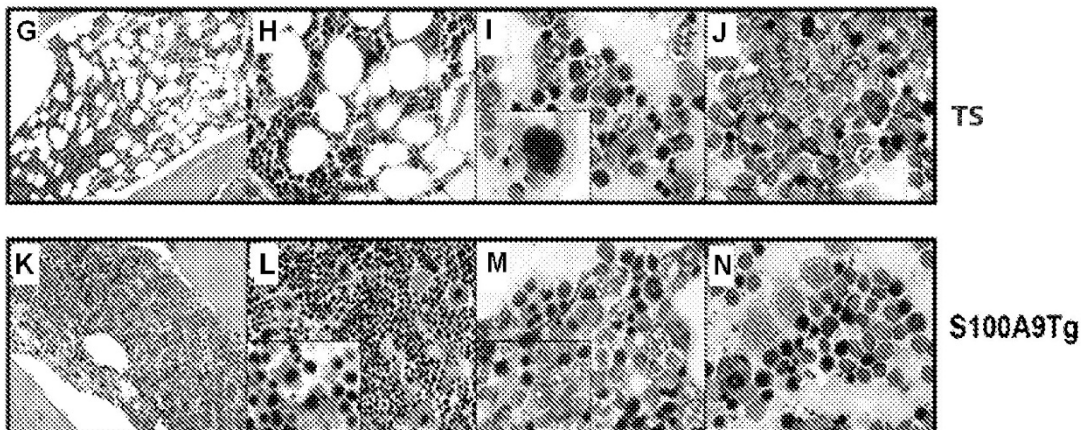


FIGURA 5G – 5N

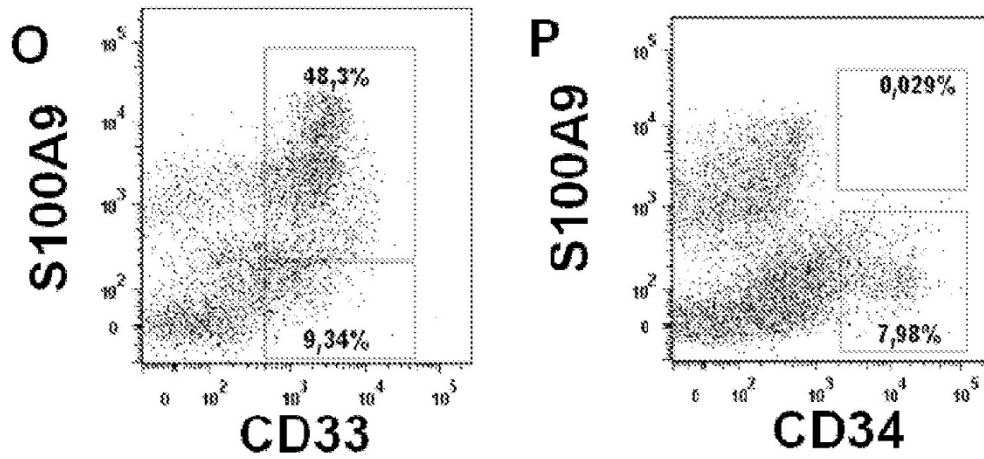


FIGURA 50 – 5P

CMSP después de la transferencia competitiva

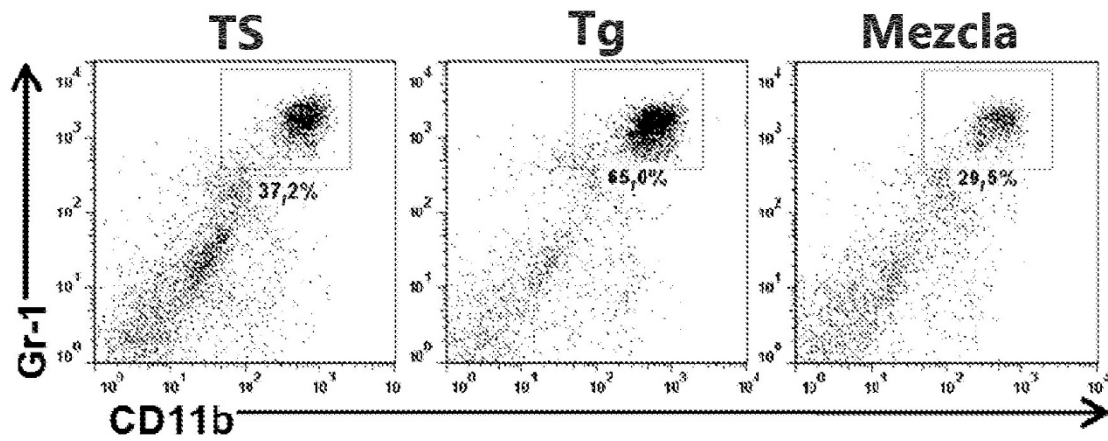


FIGURA 6A

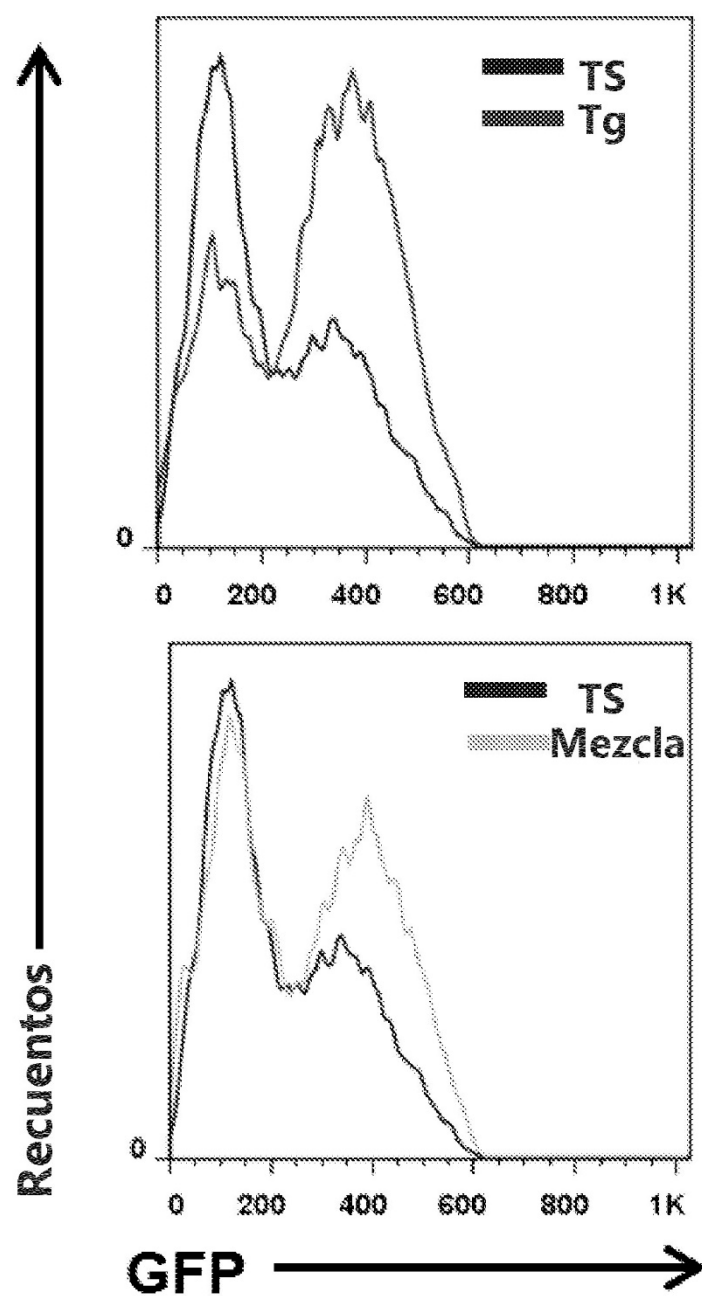


FIGURA 6B

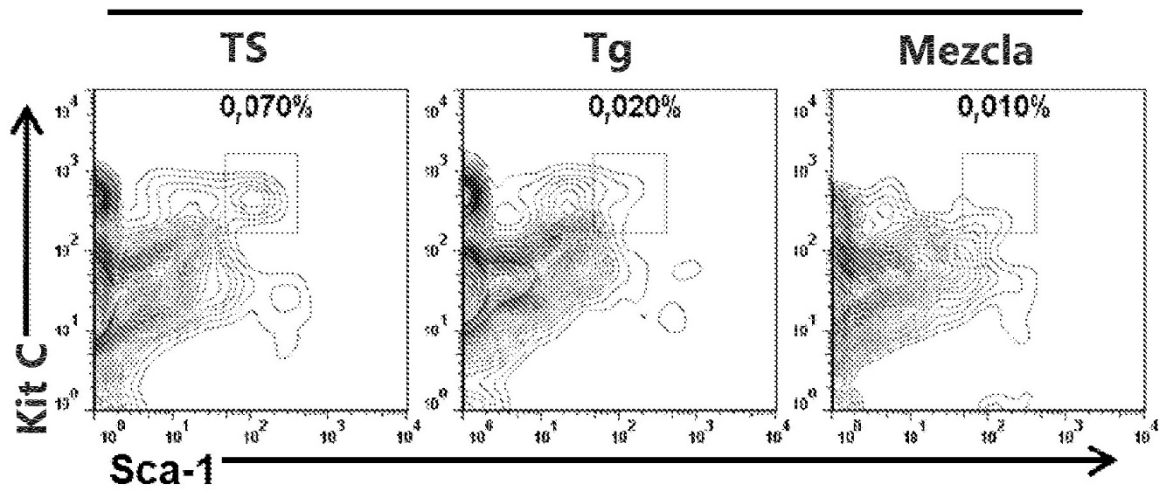


FIGURA 6C

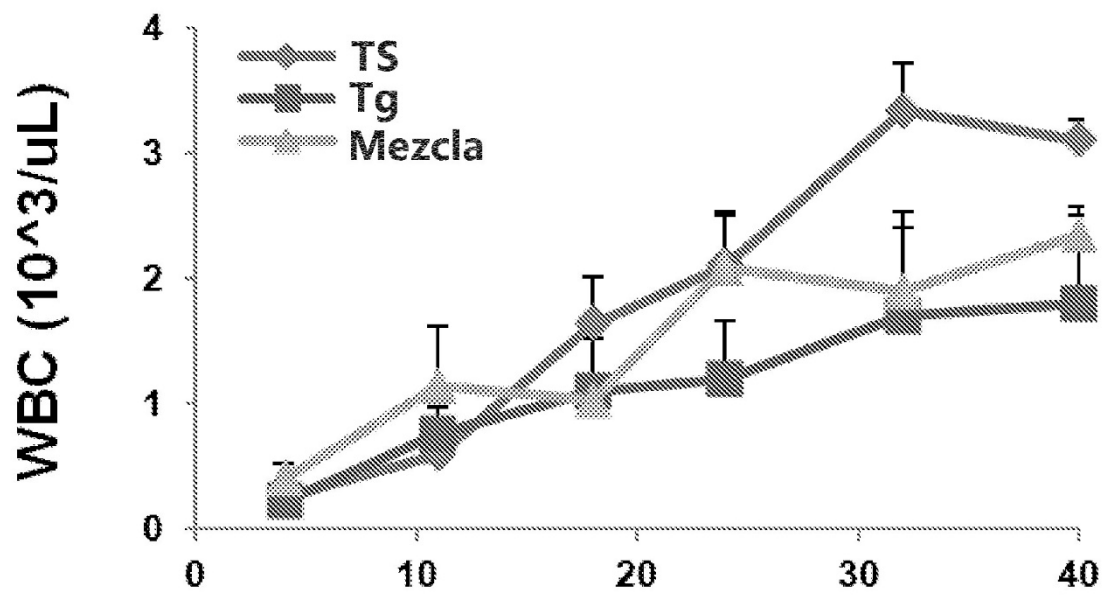


FIGURA 6D

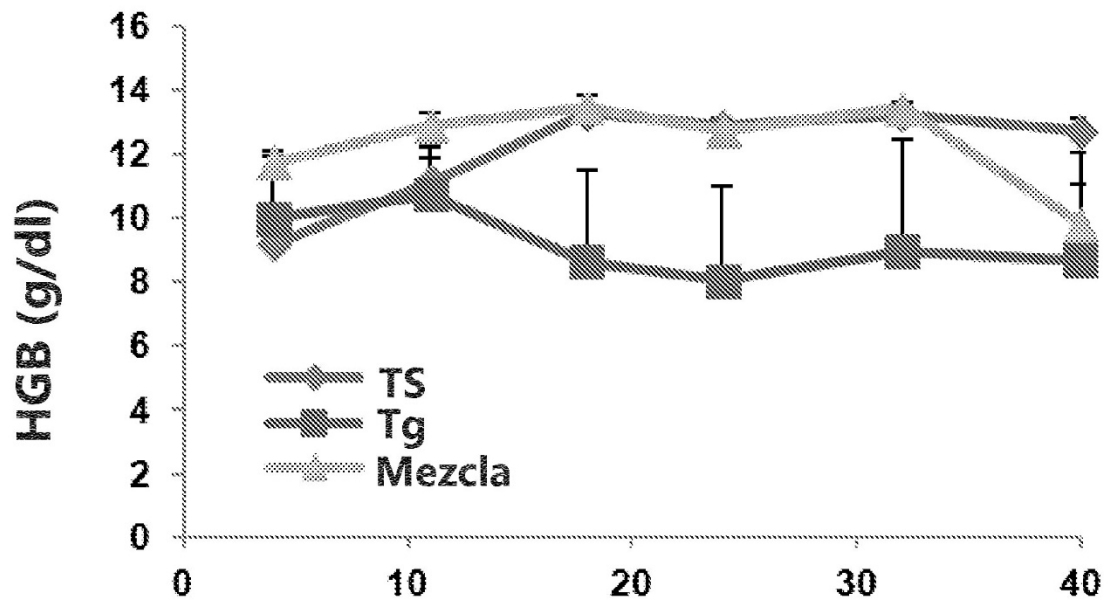


FIGURA 6E

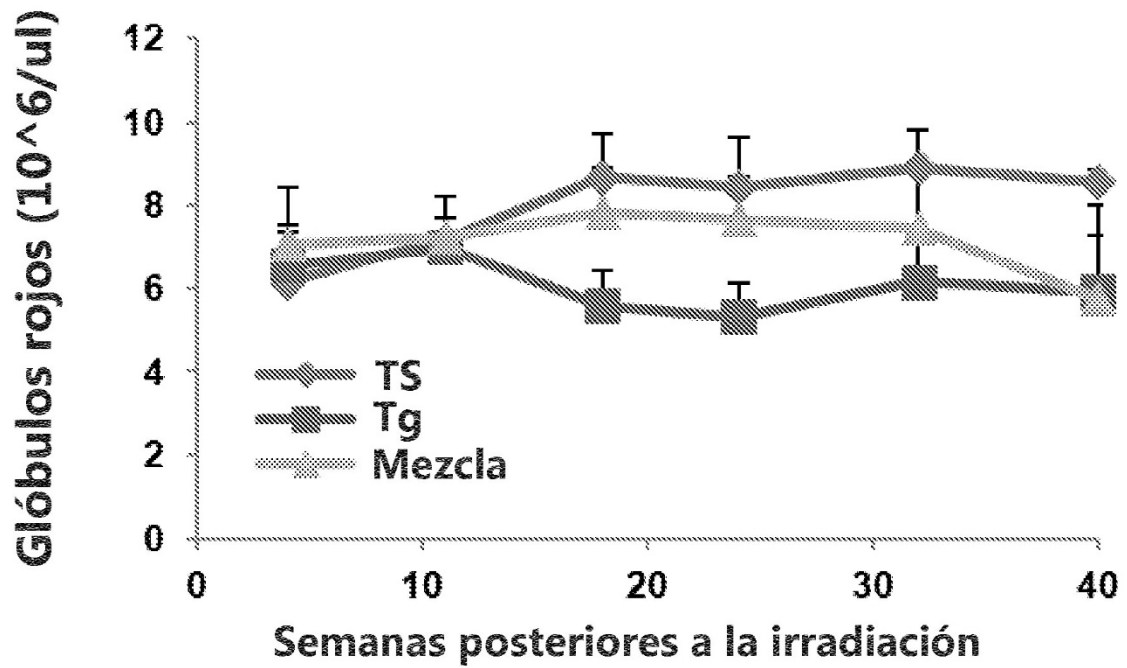


FIGURA 6F

CD34⁺ de las CMSP⁻ de la MO con MDSos

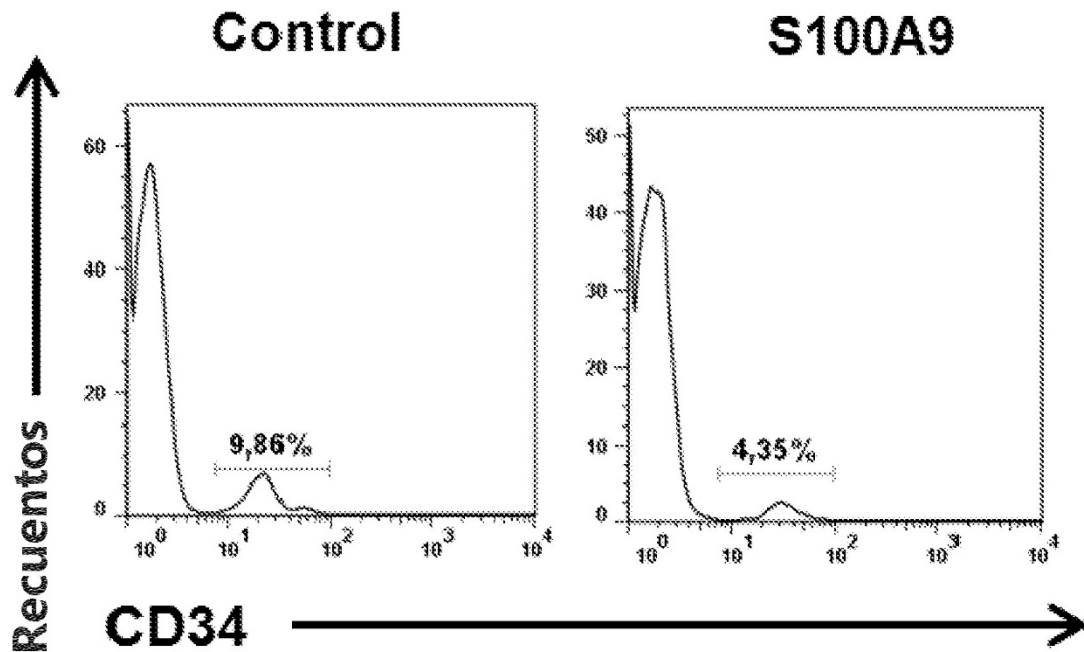


FIGURA 6G

CD34⁺ de las CMSP⁻ de la MO con MDSos

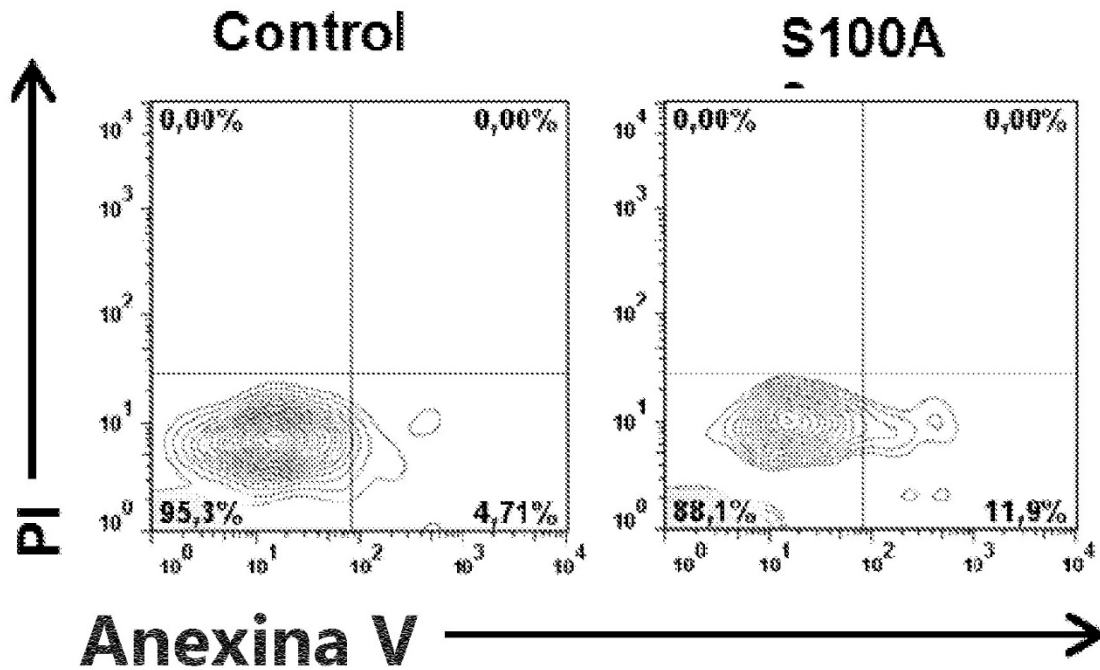


FIGURA 6H

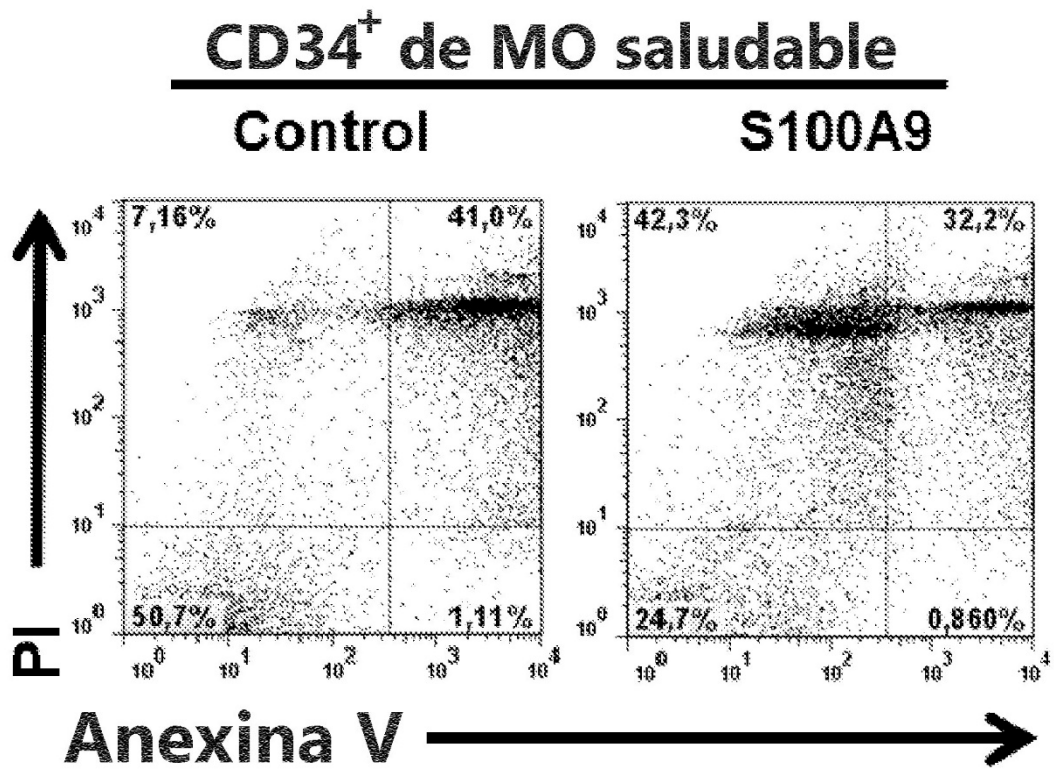


FIGURA 6I

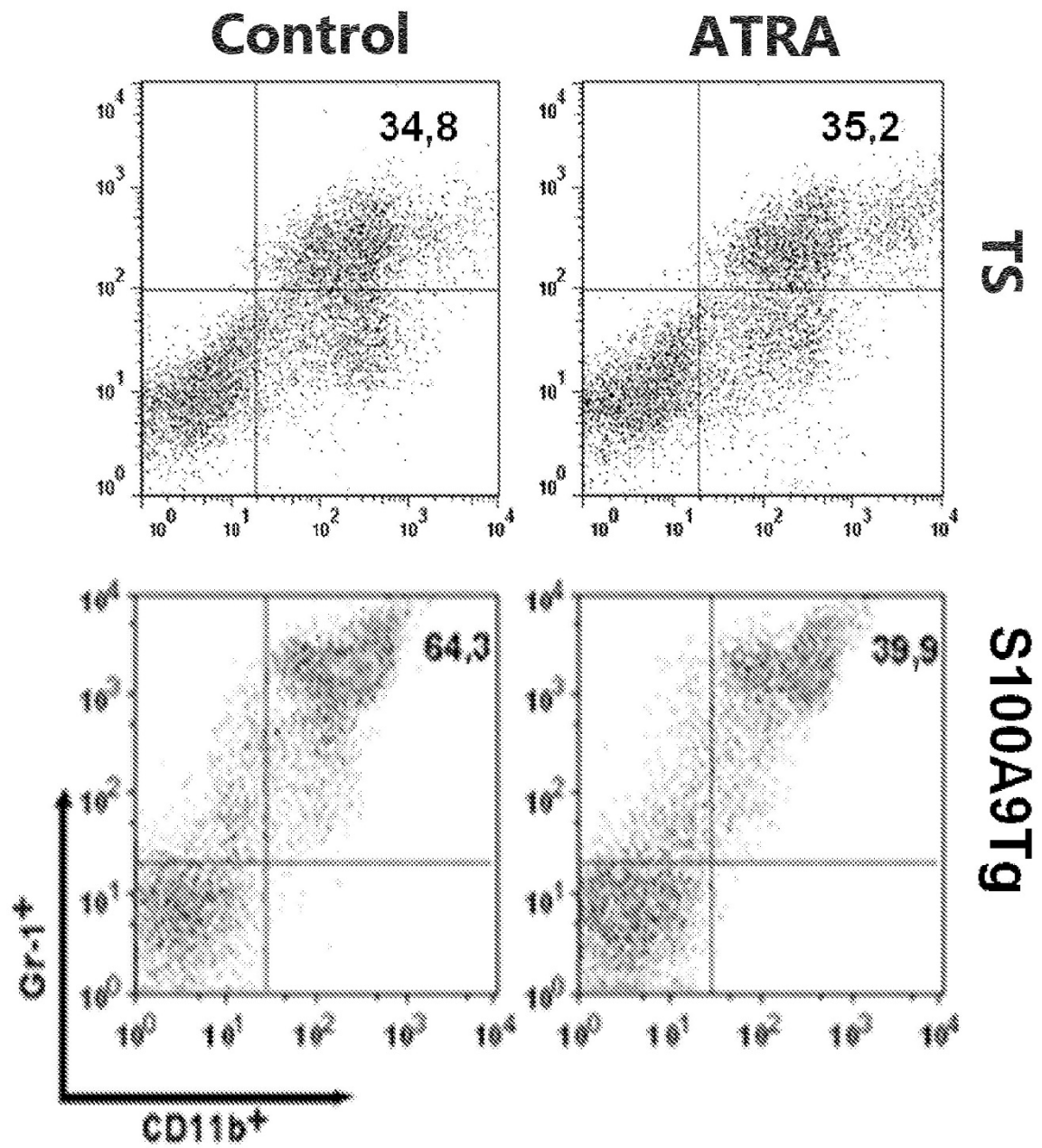


FIGURA 7A

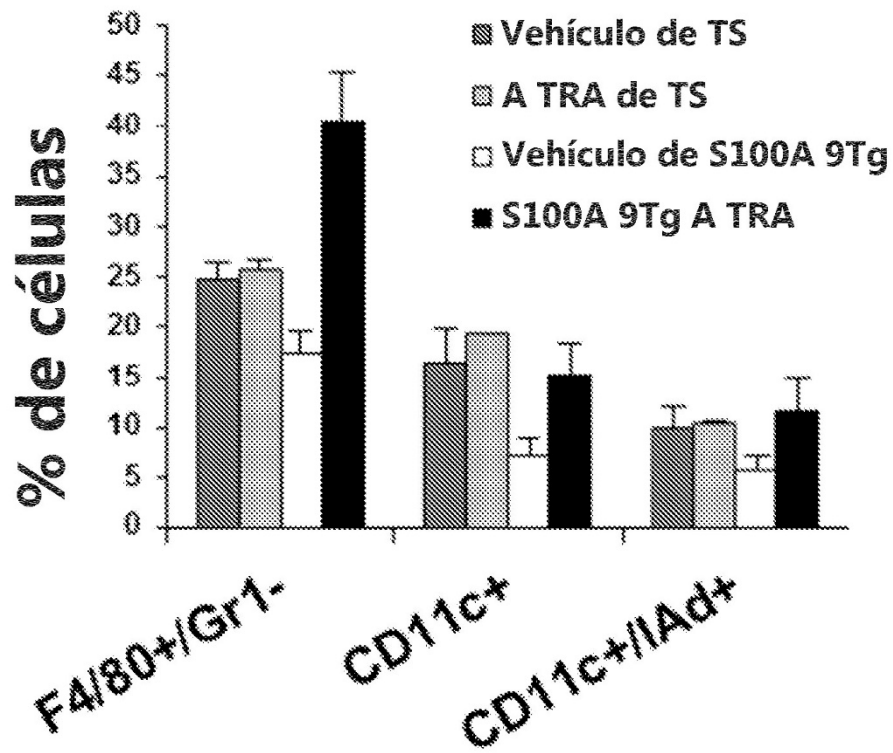


FIGURA 7B

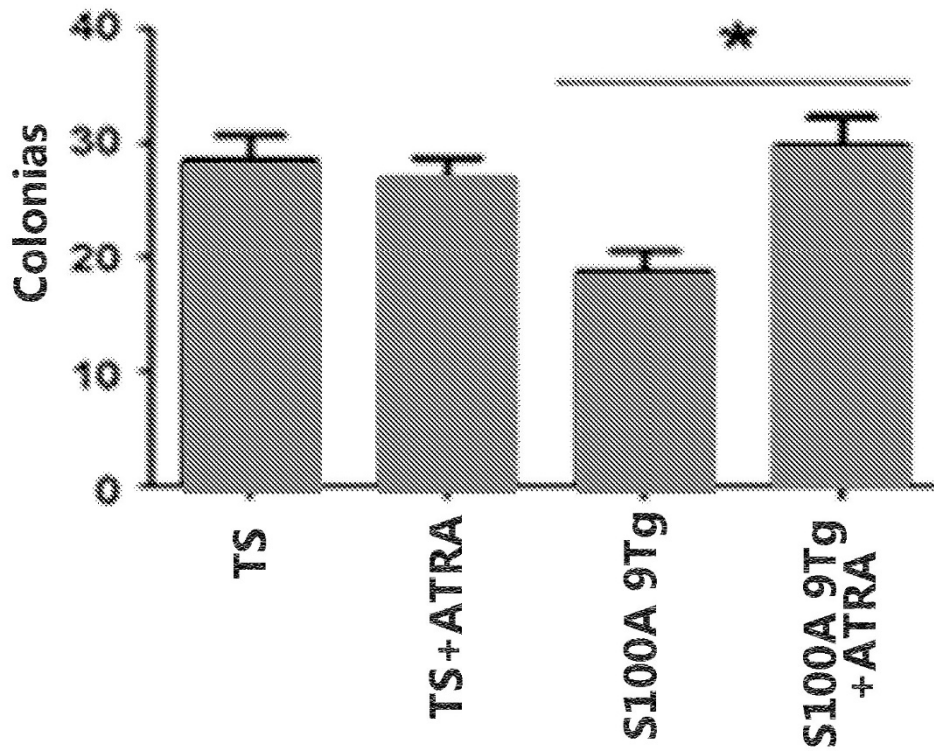


FIGURA 7C

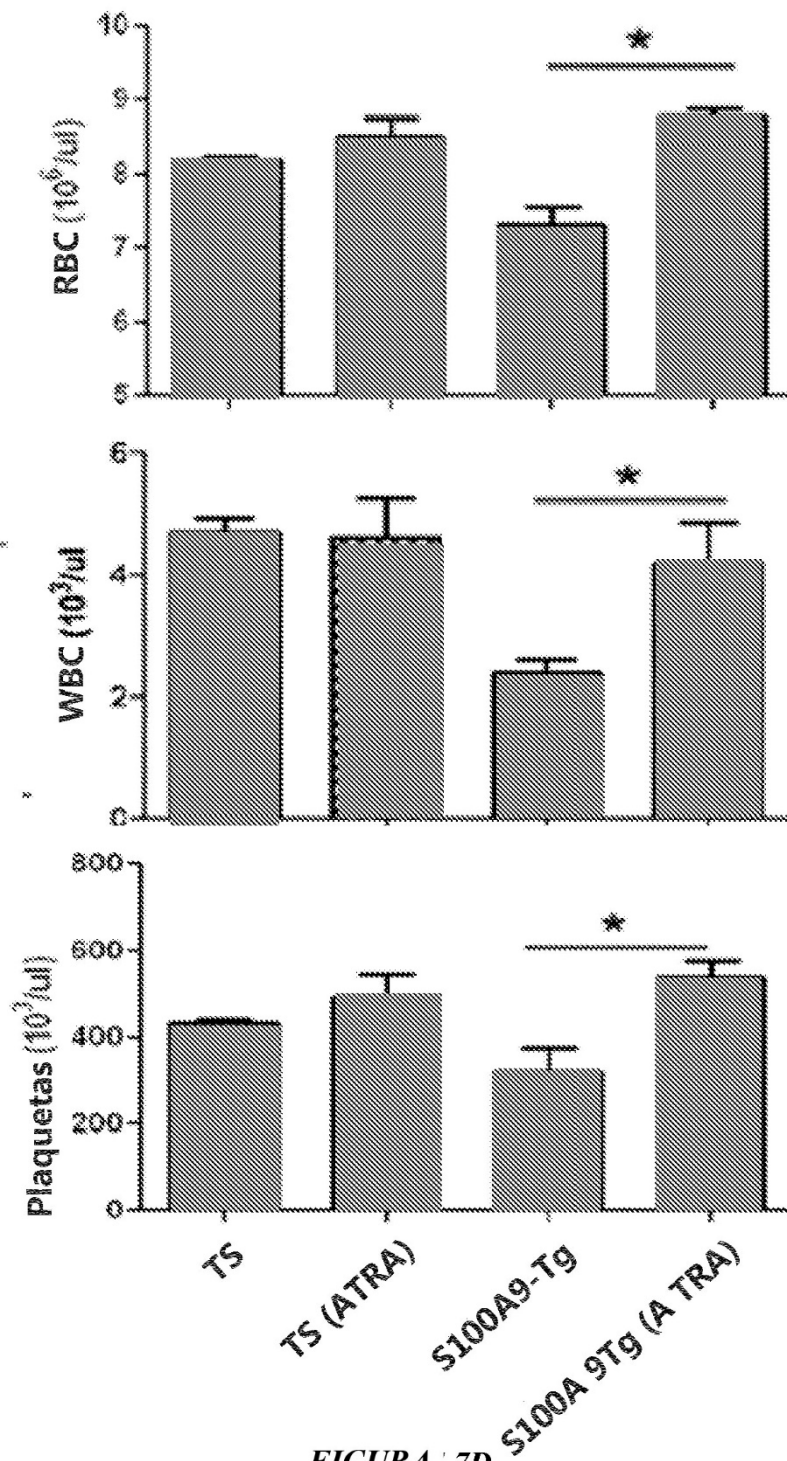
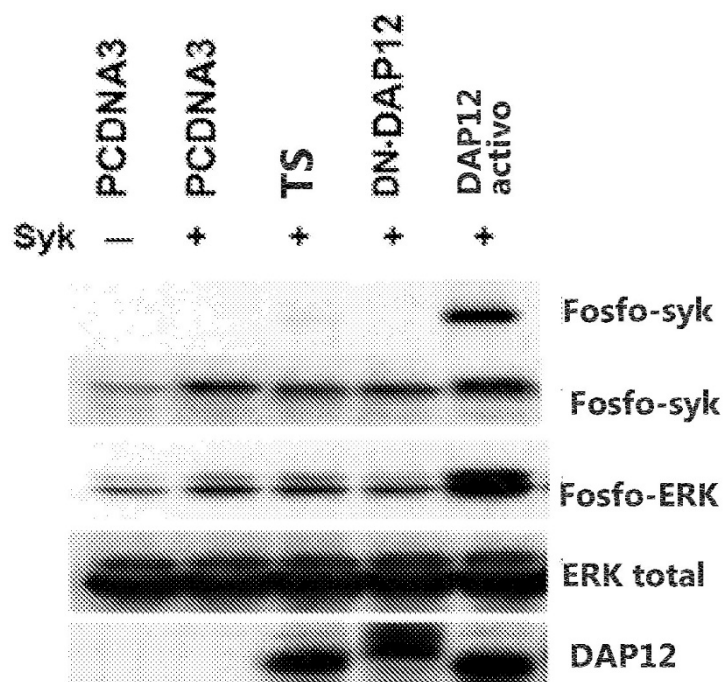
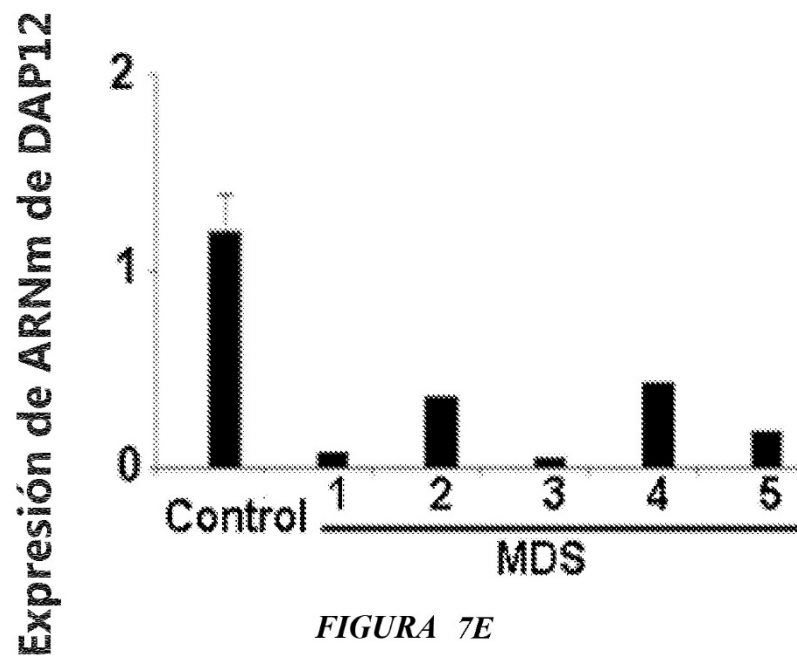


FIGURA 7D



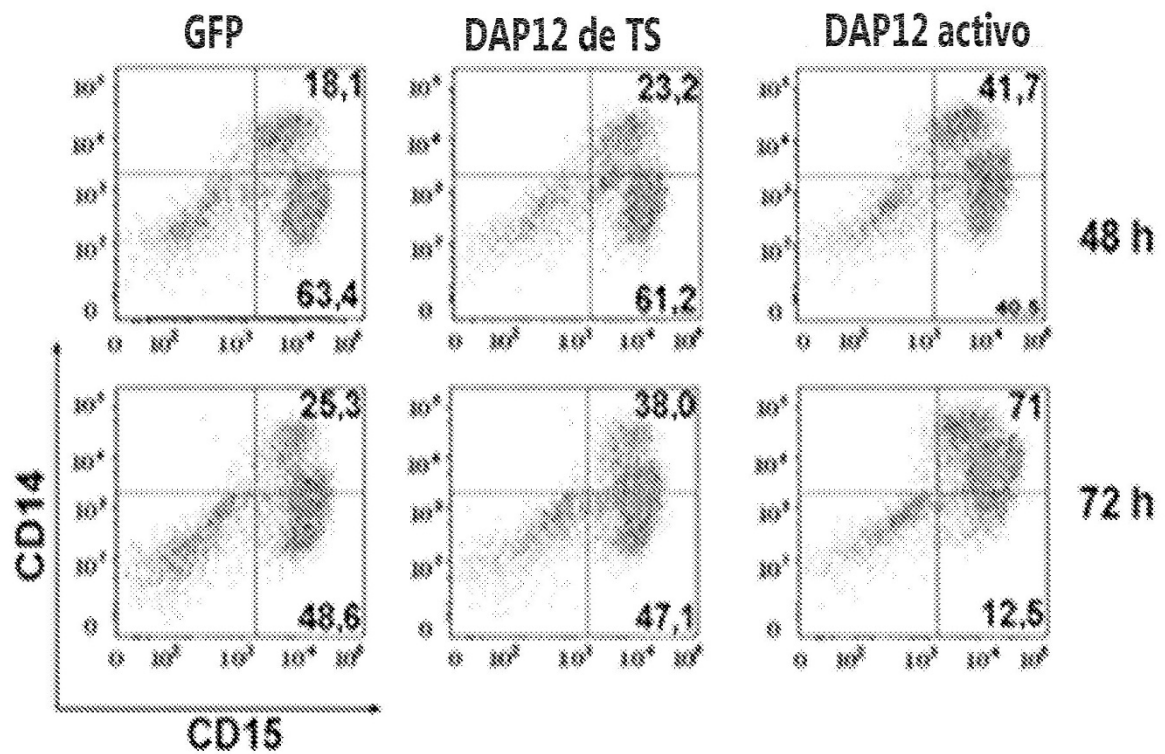


FIGURA 7G

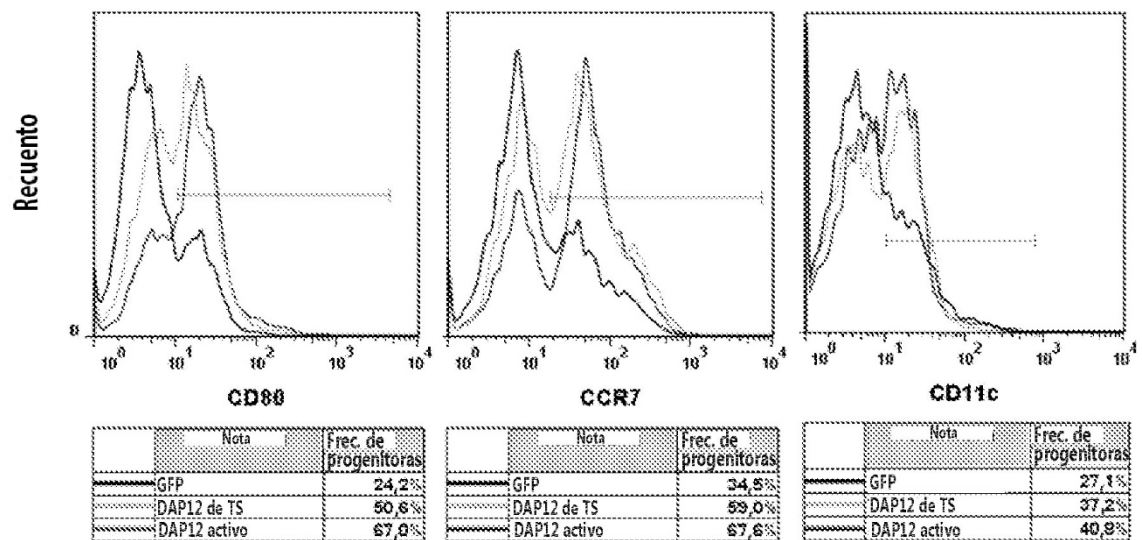


FIGURA 7H

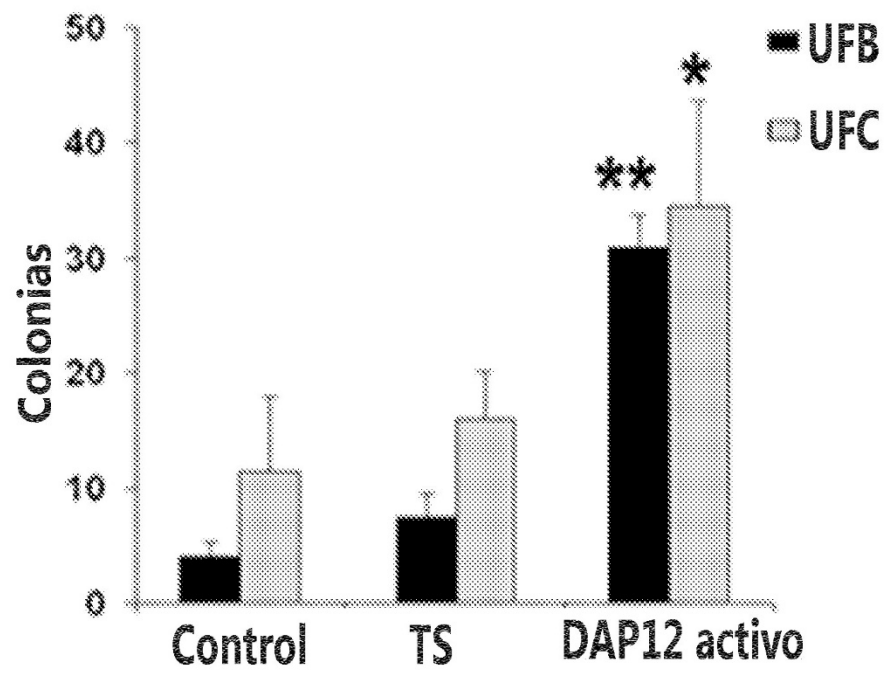


FIGURA 7I

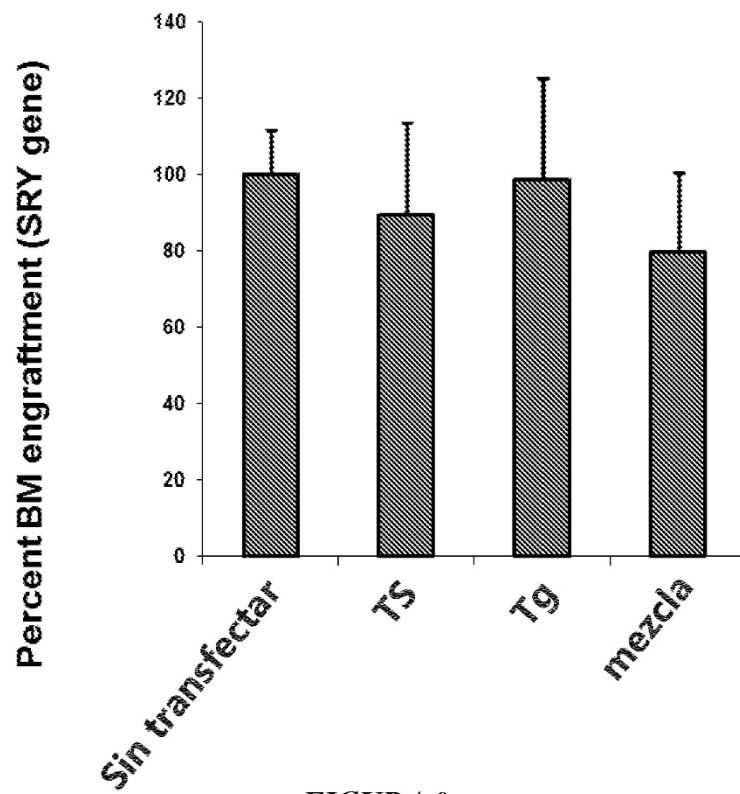


FIGURA 8

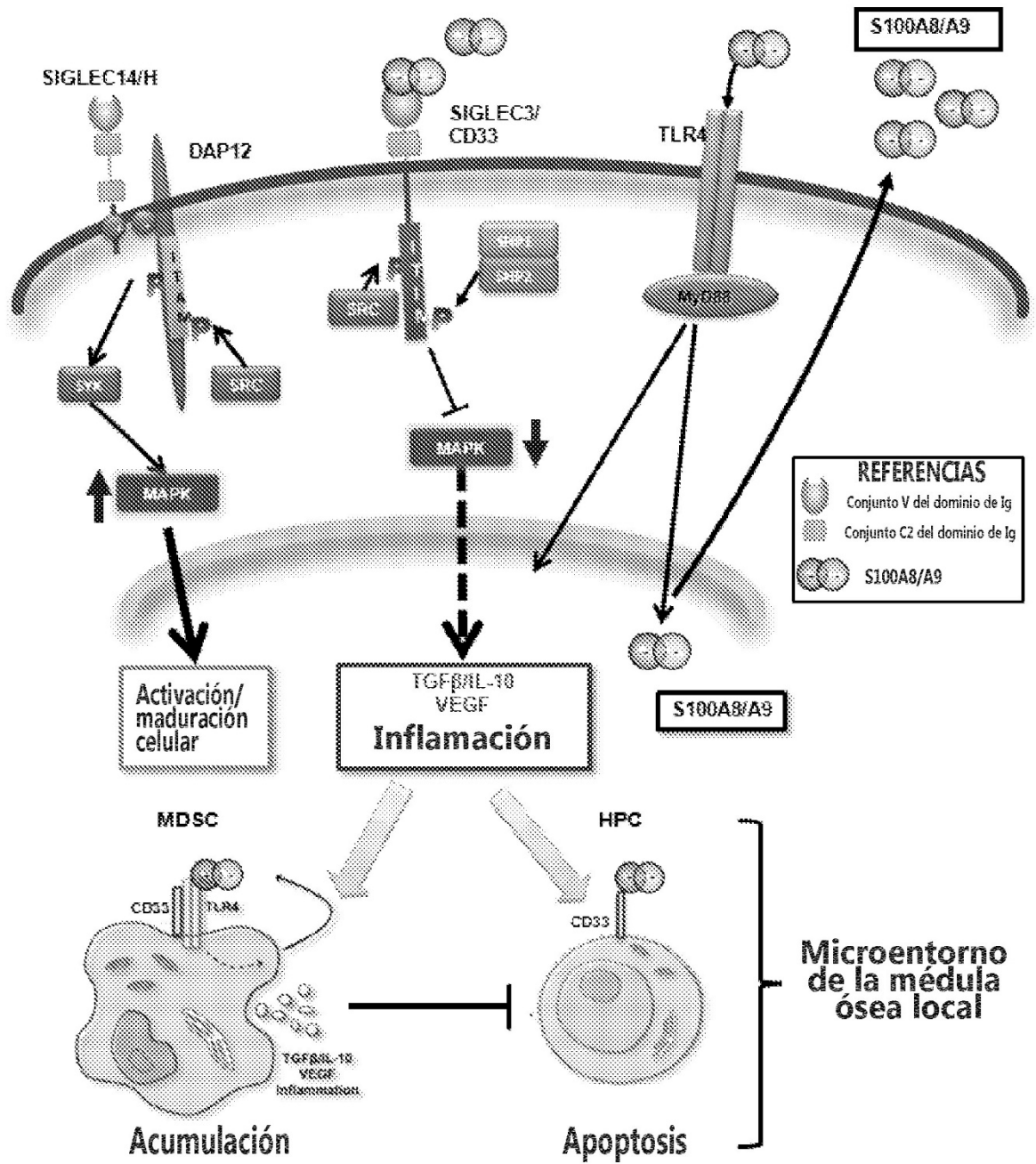


FIGURA 9

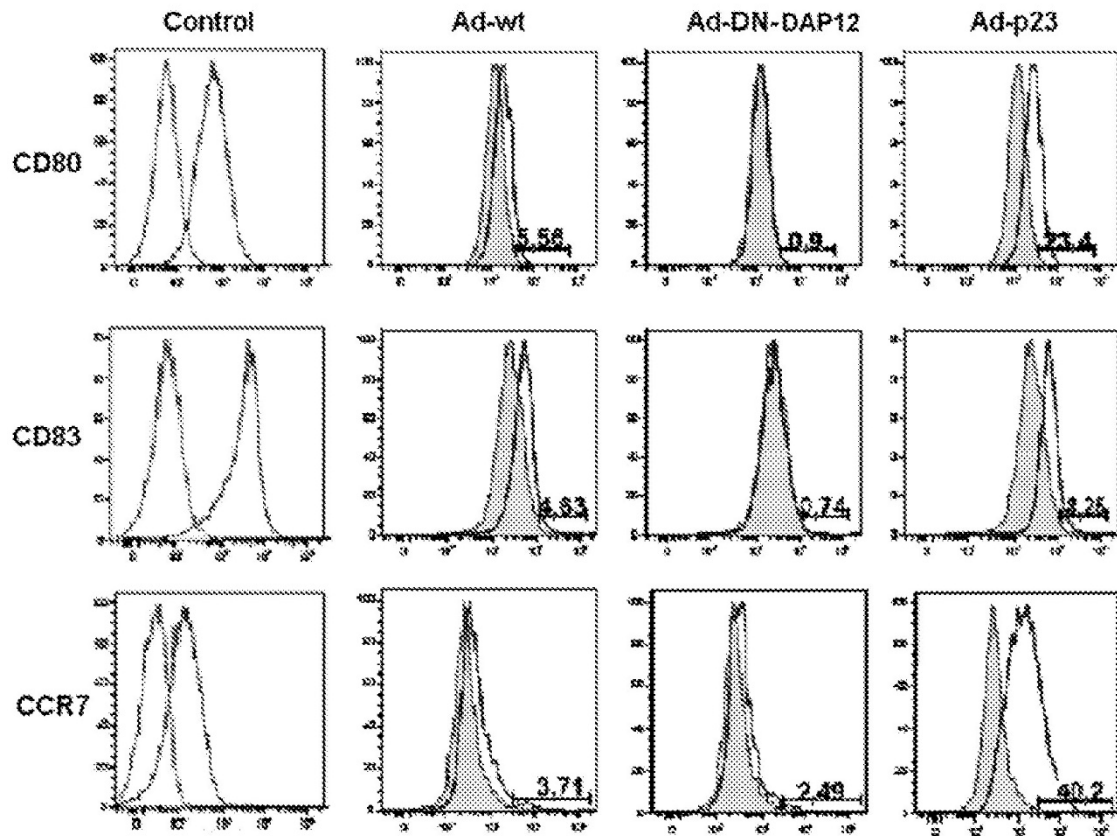


FIGURA 10

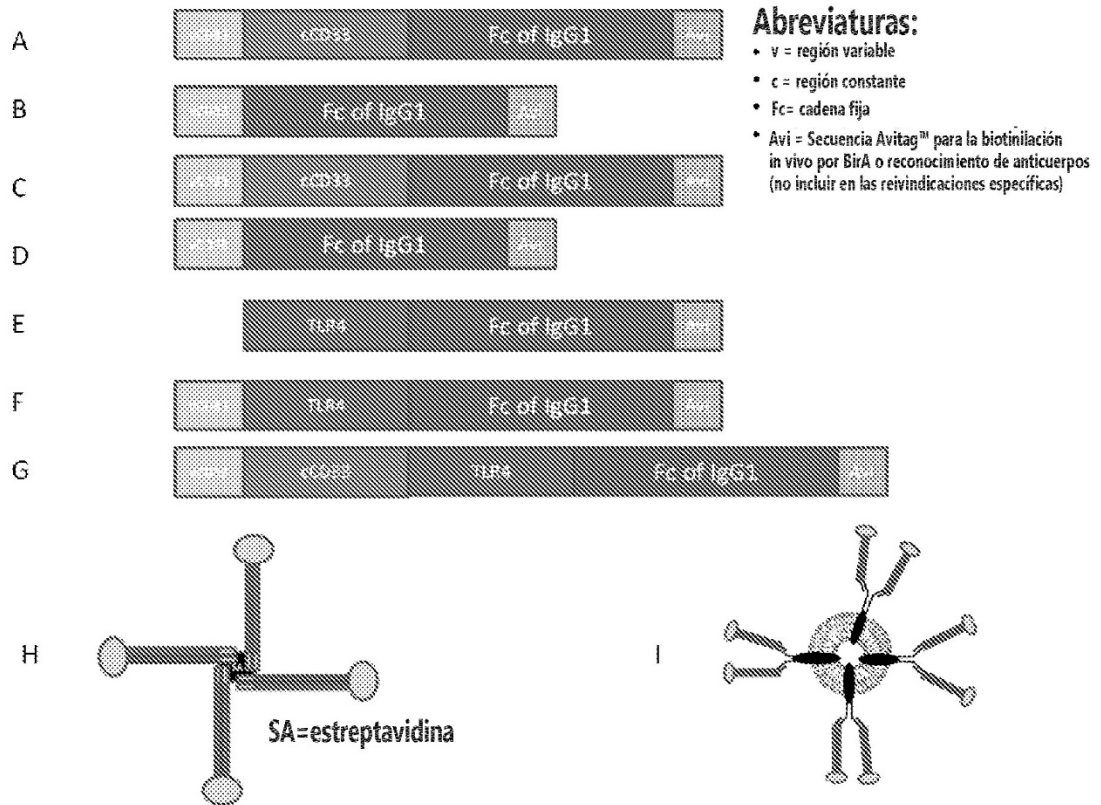


FIGURA 11A-III

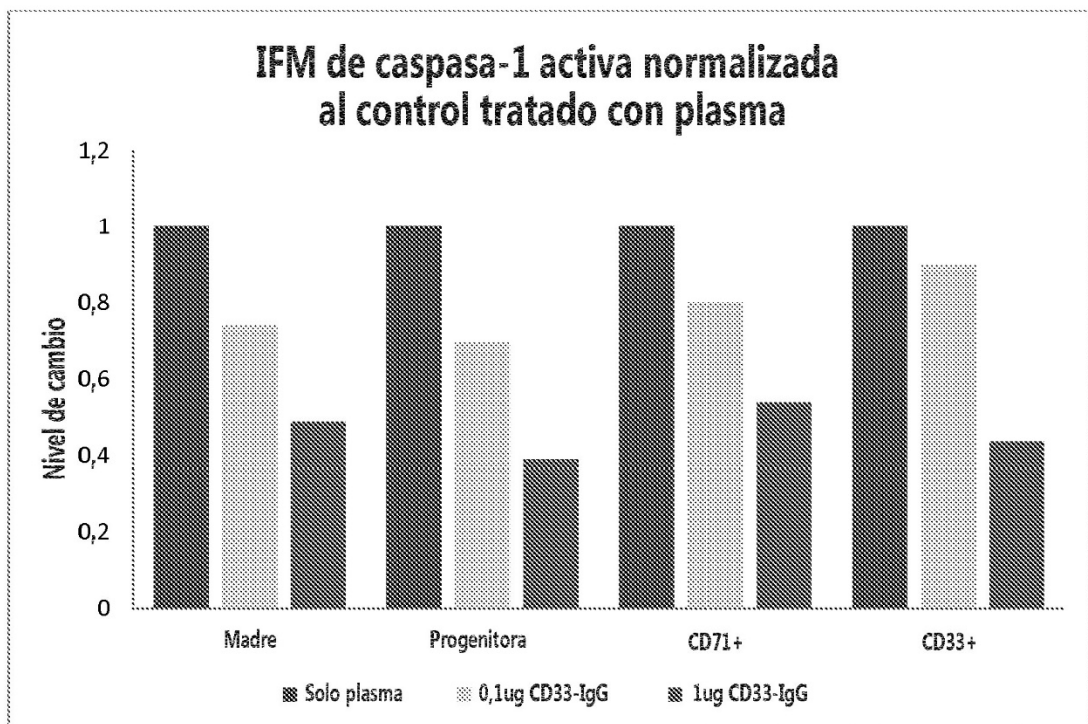


FIGURA 12A

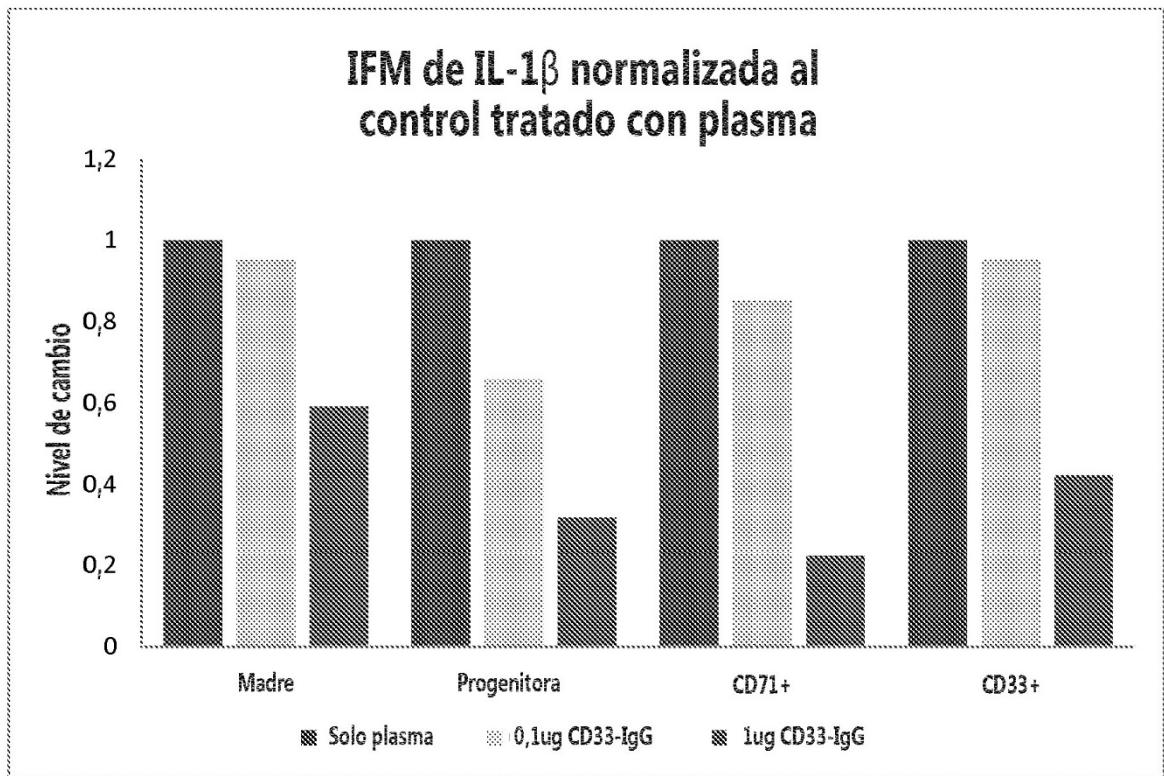


FIGURA 12B

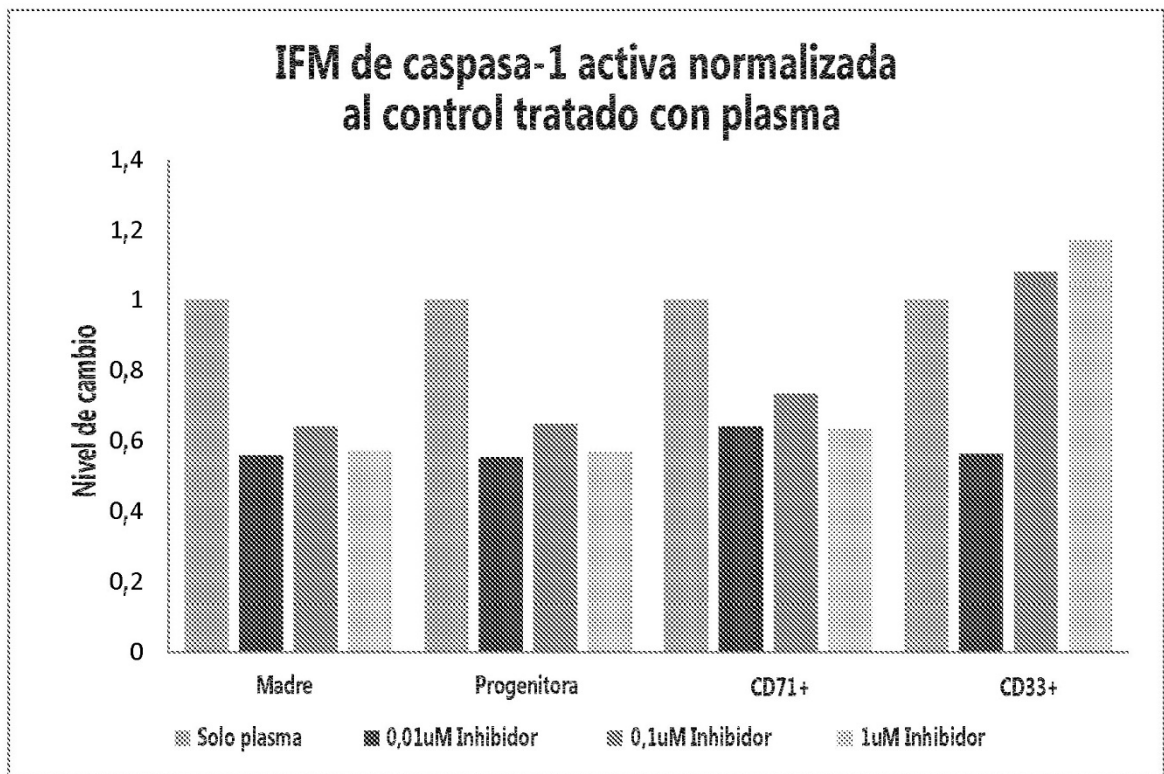


FIGURA 13A

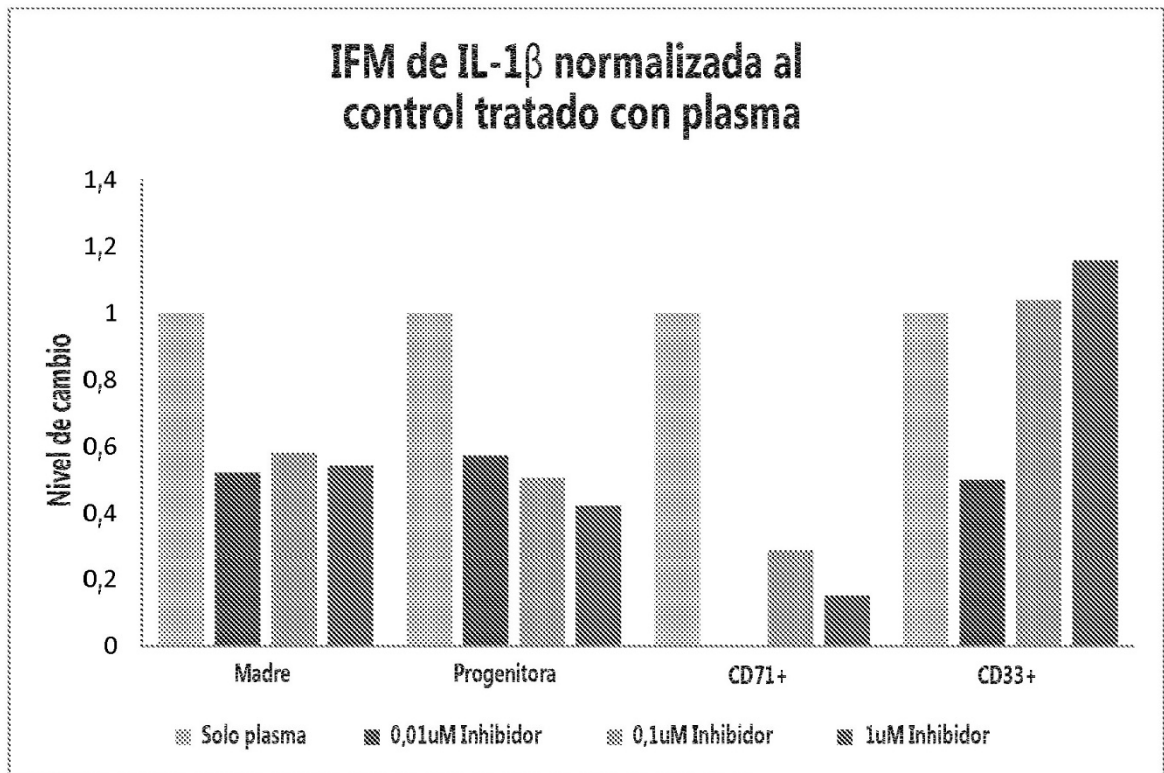


FIGURA 13B

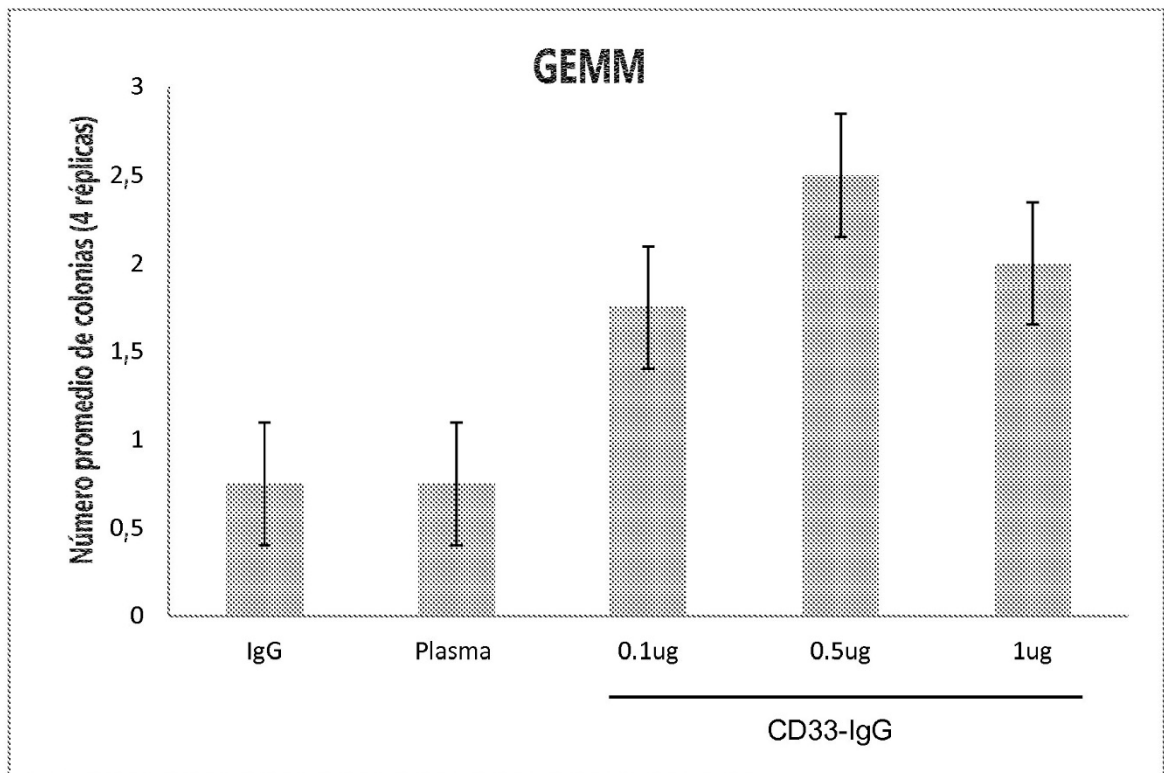


FIGURA 14A

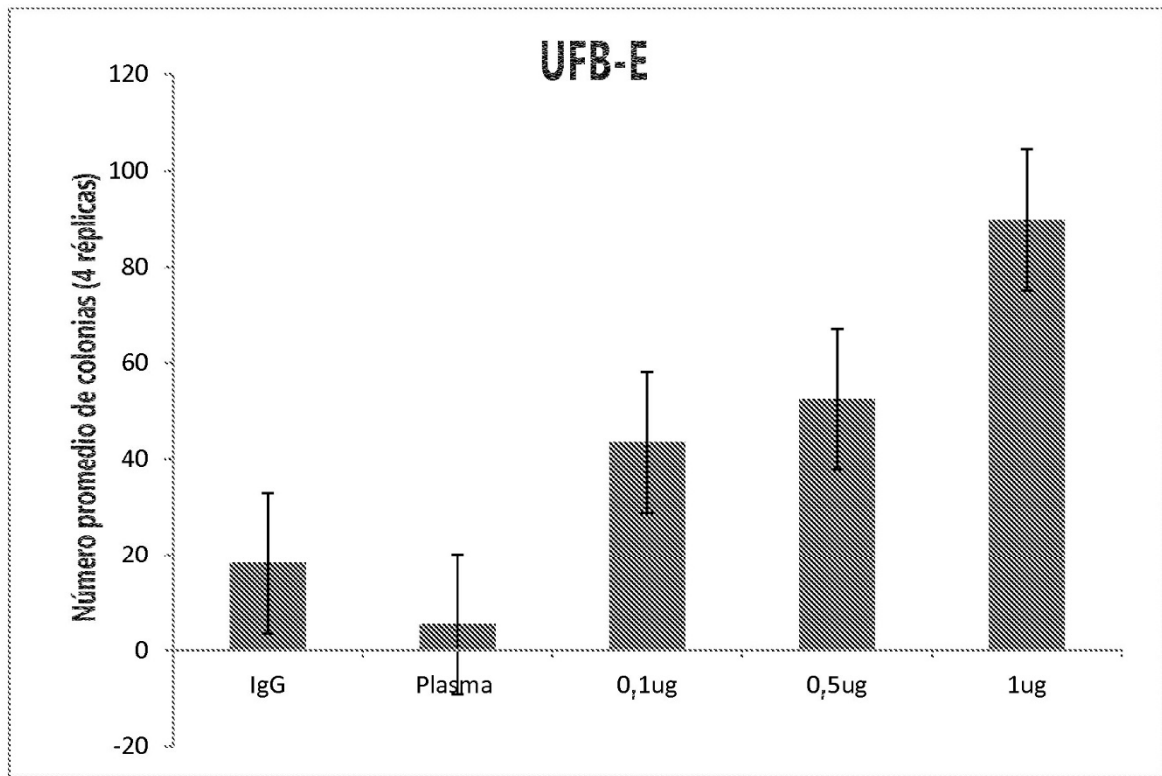


FIGURA 14B

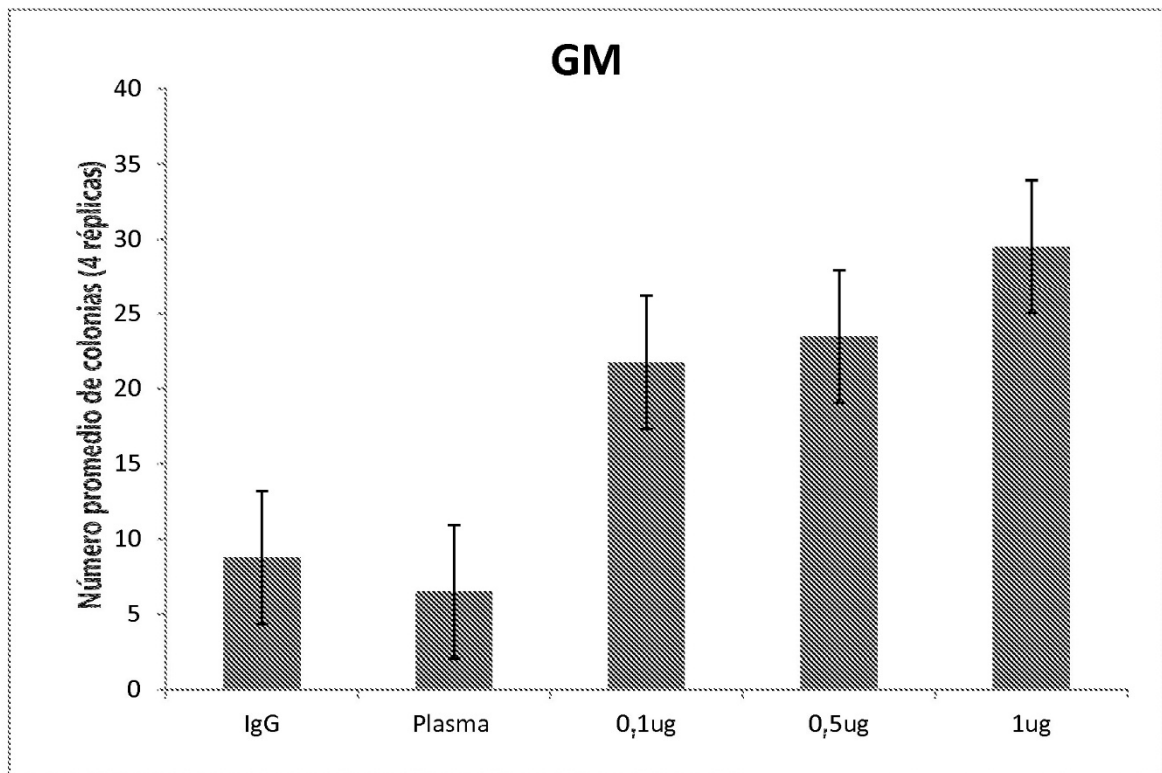


FIGURA 14C

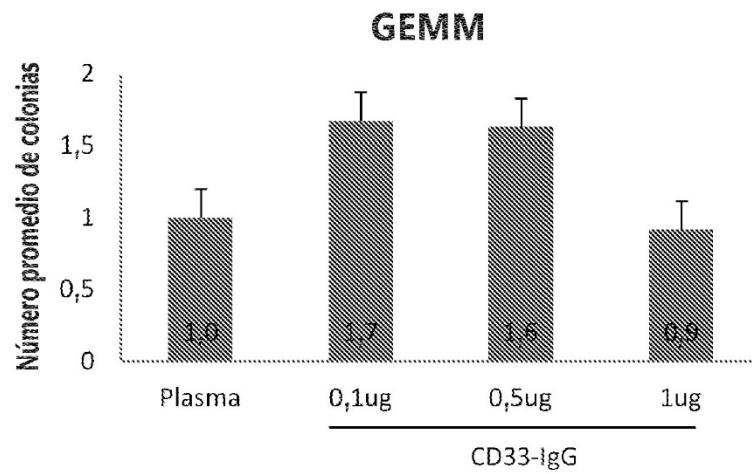


FIGURA 15A

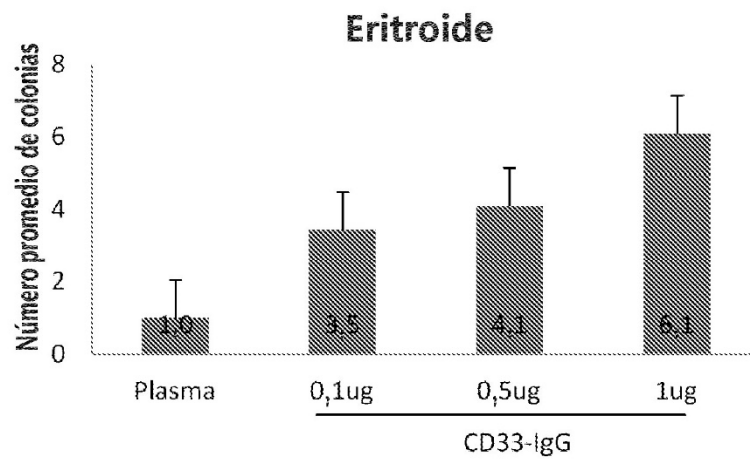


FIGURA 15B

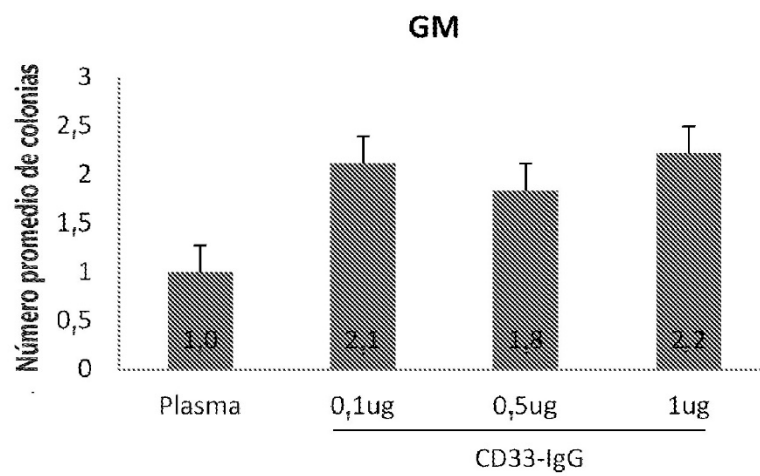


FIGURA 15C

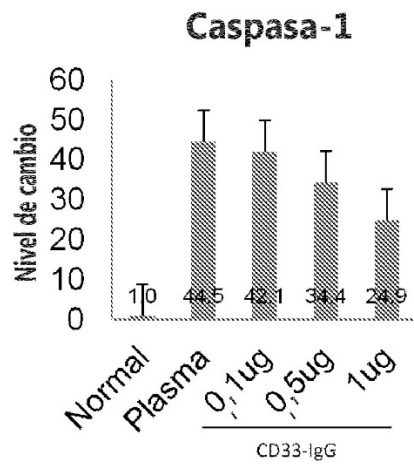


FIGURA 16A

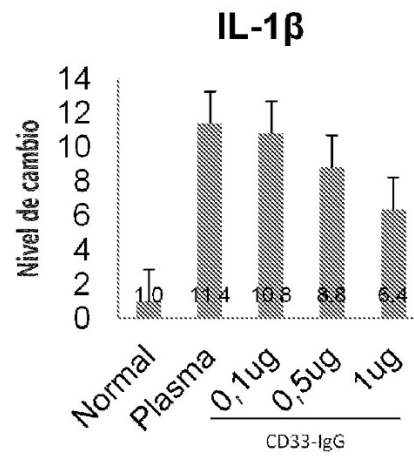


FIGURA 16B

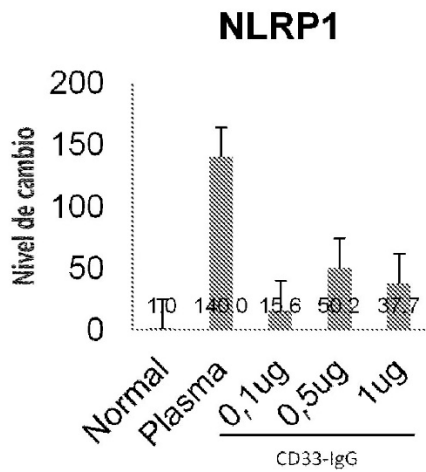


FIGURA 16C

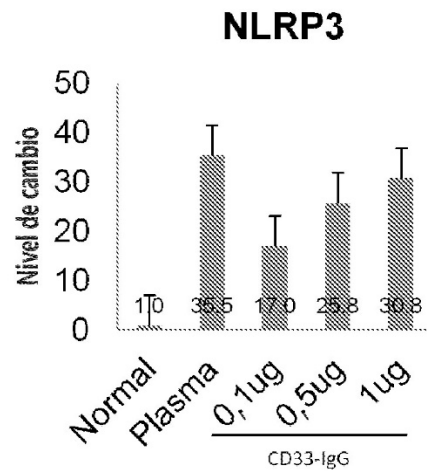


FIGURA 16D

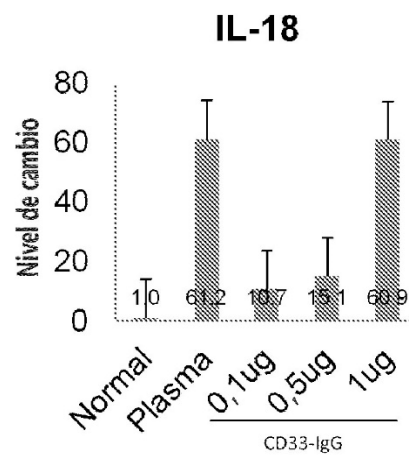


FIGURA 16E