

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 019**

21 Número de solicitud: 201630758

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

06.06.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.04.2018

Fecha de concesión:

05.02.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.02.2019

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)  
HOSPITAL REAL. AVDA. DEL HOSPICIO S/N  
18071 GRANADA (Granada) ES

72 Inventor/es:

SÁNCHEZ DE MEDINA LÓPEZ-HUERTAS,  
Fermín;  
MARTÍNEZ AUGUSTIN, Olga;  
ZARZUELO ZURITA, Antonio;  
SUÁREZ ORTEGA, María Dolores;  
OCÓN MORENO, Borja;  
ARANDA CLEMENTE, Carlos José y  
CHAZIN, Walter

54 Título: **USO DE CALPROTECTINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS  
INTESTINALES**

57 Resumen:

Uso de calprotectina para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales.

La invención está relacionada con composiciones para el tratamiento y prevención del daño o degeneración del epitelio intestinal, particularmente de enfermedades o afecciones inflamatorias intestinales, usando calprotectina, preferiblemente administrada por vía intrarrectal.

ES 2 665 019 B1

DESCRIPCIÓN

**USO DE CALPROTECTINA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES**

**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

5 La invención está relacionada con el tratamiento y prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal usando calprotectina, preferiblemente administrada por vía intrarrectal. La invención también está relacionada con composiciones adecuadas para administración intrarrectal que comprenden calprotectina (CP), así como su uso en el tratamiento y prevención de dicha enfermedad.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Enfermedad inflamatoria intestinal

15 La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, del inglés "*Inflammatory Bowel Disease*") representa un grupo de condiciones crónicas idiopáticas asociadas con diversas áreas del tracto gastrointestinal, que comprenden básicamente la colitis ulcerosa (UC, del inglés "*ulcerative colitis*") y la enfermedad de Crohn (CD, del inglés "*Crohn's disease*"). La incidencia de IBD está aumentando lentamente entre la población de los países desarrollados, resultando ser un problema significativo ya que la calidad de vida de los

20 pacientes está seriamente comprometida. La causa desencadenante subyacente de la IBD sigue siendo poco clara, pero generalmente se acepta un origen multifactorial que implica contribuciones ambientales y genéticas. La última década ha sido crítica para entender la patología de la IBD, particularmente la importancia de mantener una interacción adecuada entre la microbiota comensal y la mucosa intestinal del huésped [Rubin DC, Shaker A, Levin

25 MS. *Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer*. Front Immunol. 2012;3:107]. El epitelio está en contacto continuo con microorganismos y antígenos de la dieta, creando un sitio crucial para la regulación de la inmunidad innata y adaptativa.

30 Hoy en día, hay un creciente interés por la investigación en la regulación de los mecanismos que modulan la función de barrera intestinal, centrándose tanto en aspectos físicos como inmunológicos. Como actualmente se acepta que el desarrollo de la IBD depende de una respuesta inmune desregulada de la mucosa del huésped hacia la microbiota intestinal, parece factible que una función de barrera intestinal deteriorada que conduzca a una mayor

permeabilidad intestinal y/o translocación exponga el sistema inmune de la mucosa a bacterias y antígenos sin procesar, lo que podría dar como resultado una respuesta inflamatoria completa [Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, et al. *Intestinal inflammation and mucosal barrier function*. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2014; 20:2394-2404].

### Calprotectina

La calprotectina (CP) es un heterocomplejo de proteínas formada por dos subunidades de 14 y 8 kD, codificadas por los genes de ratones *S100a8* (también conocido como MRP8 o CP-10) y *S100a9* (MRP14). S100A8 y S100A9 pertenecen a la familia de proteínas S100 con dominio mano EF (*EF - hand*) para la unión de calcio. S100A8 y S100A9 son ligandos capaces de activar al menos parcialmente TLR4 [Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, et al. *Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock*. *Nat Med*. 2007;13:1042-1049] o el receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE, del inglés “receptor for advanced glycation end products”) [Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. *RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides*. *Cell*. 1999;97:889-901]. CP se expresa en neutrófilis, macrófagos, células epiteliales (incluyendo quizás células epiteliales intestinales [Lee MJ, Lee JK, Choi JW, et al. *Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 activation in experimental ulcerative colitis*. *PLoS One*. 2012;7:e38801]) y otros tipos de células. En neutrófilos, la CP comprende el 20-45% de las proteínas citosólicas. En muchos procesos inflamatorios la CP está sustancialmente elevada y ha sido ampliamente estudiada como un biomarcador de la actividad de la enfermedad, especialmente en IBD, donde la CP se mide en heces para realizar el diagnóstico [Tibble JA, Bjarnason I. *Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*. 2001;7:460-465]. La CP se ha considerado generalmente una proteína proinflamatoria, principalmente vía ligadura de TLR4, actuando como un alarmina en sitios inflamatorios [Loser K, Vogl T, Voskort M, et al. *The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells*. *Nat Med*. 2010;16:713-717]. S100A8 es un quimioatrayente leucocitario, aunque presenta una regulación atípica [Cornish CJ, Devery JM, Poronnik P, et al. *S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation*. *J Cell Physiol*. 1996;166:427-437], ya que es inducido en monocitos/macrófagos por la citoquina antiinflamatoria IL-10 y es potenciado por glucocorticoides [Hsu K, Passey RJ, Endoh Y, et al. *Regulation of S100A8 by*

*glucocorticoids*. J Immunol. 2005;174:2318-2326], [Xu K, Yen T, Geczy CL. *Il-10 up-regulates macrophage expression of the S100 protein S100A8*. J Immunol. 2001;166:6358-6366]. Inhibe el metabolismo oxidativo en neutrófilos [Sroussi HY, Lu Y, Villines D, et al. *The down regulation of neutrophil oxidative metabolism by S100A8 and S100A9: implication of the protease-activated receptor-2*. Molecular immunology. 2012;50:42-48] y es protector frente a sepsis en ratones, aunque se han publicado evidencias contradictorias en este sentido [Sun Y, Lu Y, Engeland CG, et al. *The anti-oxidative, anti-inflammatory, and protective effect of S100A8 in endotoxemic mice*. Molecular immunology. 2013;53:443-449]. La calprotectina también muestra propiedades antibacterianas debido, al menos parcialmente, a su capacidad para unirse firmemente y secuestrar metales de transición [Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, et al. *Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of Staphylococcus aureus*. Cell host & microbe. 2011;10:158-164]. La CP también juega un papel importante en la biología de la piel [Kerkhoff C, Voss A, Scholzen TE, et al. *Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology*. Exp Dermatol. 2012;21:822-826], pulmón [Hiroshima Y, Hsu K, Tedla N, et al. *S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury*. J Immunol. 2014;192:2800-2811], en cáncer [Markowitz J, Carson WE, 3rd. *Review of S100A9 biology and its role in cancer*. Biochim Biophys Acta. 2013;1835:100-109] y en infecciones fúngicas [Mehra T, Koberle M, Braunsdorf C, et al. *Alternative approaches to antifungal therapies*. Exp Dermatol. 2012;21:778-782].

En la medida en que la CP está claramente sobreexpresada en el intestino inflamado y tiene acciones proinflamatorias como se ha descrito anteriormente, se podría esperar que contribuya a la respuesta inflamatoria en la enfermedad inflamatoria del intestino y en la inflamación intestinal en general. Sin embargo, no hay evidencia directa disponible sobre el papel de la CP en la inflamación intestinal.

Con respecto a los usos de calprotectina como agente antiinflamatorio, [US20090305985] describe el uso de S100A8 y/o S100A9 como agentes inmunomoduladores para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Sin embargo, esta patente no describe detalles específicos tales como la administración de calprotectina por la vía intrarrectal, ni tampoco las desventajas de su administración por vía intraperitoneal, y no induciría a un experto en materia a utilizar CP para el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Más bien, en su mayor parte presenta datos in vitro que

describen los efectos moduladores quimiotácticos de S100A8 y S100A9 separadamente (es decir, no como calprotectina sino como monómeros, ya sea en forma nativa o como secuencias modificadas), junto con algunos otros datos acerca de los efectos sobre el crecimiento microbiano que tienen poca o ninguna relevancia con el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. En dicho documento se indica que que los monómeros S100A8 y S100A9 tenían un efecto fugetáctico (anti-quimiotáctico) a concentraciones en el intervalo 1 nM - 1 pM en monocitos humanos y neutrófilos en ensayos en agarosa y transwell, y efectos quimiotácticos a 0,1-1 nM en linfocitos en ensayos transwell. No se presentan ensayos con calprotectina. Existe una sola prueba in vivo usando el modelo inflamatorio agudo de bolsa de aire de rata y una variante de S100A8, no de calprotectina, administrada intraperitonealmente. Debe observarse que este modelo, aunque útil para fines de cribado, tiene muy poca validez en términos de correlación con la actividad terapéutica en la inflamación intestinal. Por ejemplo, los agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como ibuprofeno y fármacos relacionados son activos en el modelo de bolsa de aire [Goindi S, Narula M, Kalra A. *“Microemulsion-Based Topical Hydrogels of Tenoxicam for Treatment of Arthritis”*. AAPS PharmSciTech. 2015 Aug 19], [Jukanti R1, Devaraj G, Devaraj R, Apte S. *“Drug targeting to inflammation: studies on antioxidant surface loaded diclofenac liposomes”* Int J Pharm. 2011 Jul 29;414(1-2):179-85] pero realmente agravan la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) [Long MD1, Kappelman MD, Martin CF, Chen W, Anton K, Sandler RS. *“Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Exacerbations of Inflammatory Bowel Disease”*. J Clin Gastroenterol. 2016 Feb; 50(2):152-6].

La secuencia completa de S100A8 es conocida y se puede acceder a ella, por ejemplo, en [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6279#reference-sequences]. La secuencia completa de S100A9 también es conocida y se puede acceder a ella, por ejemplo, en [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6280#reference-sequences].

SEQ S100A8:

30 MLTELEKALNSIIDVYHKYSLIKGNFHAVYRDDLKKLLETECPQYIRKKGADVWFKELDI  
NTDGAVNFQEFLLILVIKMGVAAHKKSHKES

SEQ S100A9:

MTCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLKKNKNEKIVIE

HIMEDLDTNADKQLSFEEFIIMLARLTWASHEKMHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP

### **OBJETO DE LA INVENCION**

5 El objeto de esta invención está relacionado con el uso de calprotectina (CP) en el tratamiento del daño o degeneración del epitelio intestinal, particularmente en enfermedades o afecciones relacionadas con la inflamación intestinal.

10 Los inventores pretendían establecer el papel de CP en la inflamación intestinal y su posible uso terapéutico usando el modelo de Dextran Sulfato Sodio (DSS) de colitis en ratones. Sus resultados han mostrado que CP tiene efectos protectores dosis-dependientes cuando se administra por vía intrarrectal, pero no por vía intraperitoneal. Además, CP muestra efectos inmunoestimulantes en células epiteliales intestinales, lo que indica que puede actuar sobre el epitelio desde el lado luminal (alcanzable directamente usando la vía intrarrectal). Estos resultados, además, sugieren un posible mecanismo de acción.

15 Esta invención proporciona nuevos resultados significativos en los siguientes aspectos: (1) proporciona datos sobre el valor terapéutico de calprotectina en lugar de sus componentes individuales; (2) proporciona datos valiosos sobre la utilidad de la vía intrarrectal frente a la intraperitoneal; (3) presenta información sobre las dosis activas; y (4) muestra la eficacia terapéutica de CP en un modelo de enfermedad inflamatoria intestinal real.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

25 En un primer aspecto, la presente invención está relacionada con el uso de calprotectina para el tratamiento del daño o degeneración epitelial intestinal, preferiblemente afección o enfermedad intestinal inflamatoria.

30 Un aspecto adicional de la invención es el uso de una calprotectina como un medicamento o en la preparación de un medicamento para el tratamiento de daño o degeneración epitelial intestinal, preferiblemente afección o enfermedad intestinal inflamatoria.

Otro aspecto es una composición farmacéutica, preferiblemente una composición oral, más preferiblemente para su administración tópica y aún más preferiblemente una composición

intrarrectal, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de calprotectina y al menos un vehículo, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, útil para el tratamiento del daño o degeneración del epitelio intestinal, preferiblemente afección o enfermedad intestinal inflamatoria.

5

Un aspecto adicional es un método para tratar un mamífero, preferiblemente un ser humano, contra el daño o degeneración epitelial intestinal, preferiblemente afección o enfermedad inflamatoria intestinal, que comprende administración local y/o tópica, preferiblemente administración oral, más preferiblemente administración intrarrectal, de una

10

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1.** Efecto de la CP intrarrectal sobre la pérdida de peso corporal y parámetros macroscópicos de colon en ratones colíticos DSS. La colitis se indujo con DSS al 2%, como se describe en materiales y métodos, y se trató con 50 o 100  $\mu\text{g}$  / día de CP (n = 10 por grupo). (A) Evolución del peso corporal, expresada como porcentaje del peso inicial. (B) Relación peso / longitud de colon. (C) Imágenes representativas del intestino grueso de los diferentes grupos. (D) Resultado macroscópico. (E) Peso del bazo.  $^*p < 0,05$  frente al grupo DSS. Todos los grupos son significativamente diferentes al control desde el día 5 en adelante en el panel A (no mostrado).

15

20

**Figura 2.** Histología del colon de ratones colíticos DSS tratados con CP por vía intrarrectal. Se muestran cortes histológicos representativos de hematoxilina y eosina. La colitis se indujo con DSS al 2% y se trató con 50 o 100  $\mu\text{g}$  / día de CP por vía intrarrectal (n = 10 por grupo). (A) Control; (B) DSS; (C) CP 50  $\mu\text{g}$  / día; (D) CP 100  $\mu\text{g}$  / día.

25

**Figura 3.** Efecto de la CP intrarrectal sobre la actividad de la fosfatasa alcalina (AP) colónica en ratones colíticos DSS. (A) Fosfatasa alcalina (AP). (B) Inhibición de la actividad de AP colónica por levamisol *in vitro*. La colitis se indujo con DSS al 2% y se trató con 50 o 100  $\mu\text{g}$  / día de CP por vía intrarrectal (n=10 por grupo). La actividad de AP se midió por espectrofotometría y se determinó su sensibilidad al inhibidor específico levamisol. Los valores son medias  $\pm$  SEM.  $^*p < 0,05$  vs. grupo control;  $^*p < 0,05$  vs. grupo DSS.

30

**Figura 4.** Efecto de la CP intrarrectal sobre la expresión de mieloperoxidasa de colon (MPO) y S100A8 en ratones colíticos DSS. (A) Actividad de MPO colónica. (B) niveles de mRNA de S100A8 (C) Inmunotinción de MRP8 (S100A8). La colitis se indujo con DSS al 2% y se trató con 50 o 100 µg / día de CP por vía intrarrectal (n=10 por grupo). La actividad de MPO se midió mediante espectrofotometría. S100A8 se determinó por RT-PCR e inmunohistoquímica. Los valores son medias ± SEM con los errores estándar representados por barras verticales. \*p<0,05 vs. grupo control; \*p < 0,05 vs. grupo DSS.

**Figura 5.** Expresión colónica de diferentes genes en ratones DSS con colitis tratados con CP 50 o 100 µg / día o vehículo por vía intrarrectal. La colitis se indujo con DSS al 2% y se trató con 50 o 100 µg / día de CP por vía intrarrectal (n=10 por grupo). Los niveles de mRNA se midieron por T-PCR. (A) Niveles de expresión de IL-10 mediante FOXP3. (B) IL-22. (C) TLR4. Los valores son medias ± SEM. \*p<0,05 vs. grupo control; \*p < 0,05 vs. grupo DSS.

**Figura 6.** Secreción de citoquinas por el bazo (A, B) o células de nódulos linfáticos mesentéricos (C, D) *ex vivo* en ratones con colitis DSS tratados con CP por vía intrarrectal. La colitis se indujo con DSS al 2% y se trató con 50 o 100 µg / día de CP por vía intrarrectal (n=10 por grupo). Las células se aislaron y cultivaron con o sin concanavalina A, y los niveles de citoquinas en el sobrenadante se midieron mediante ELISA (A, C) producción de IL-17 y (B,D) producción de IL-10. Los valores son medias ± SEM. \*p<0,05 vs. grupo control; \*p < 0,05 vs. grupo DSS.

**Figura 7.** Análisis de las poblaciones de leucocitos en el bazo de los ratones con colitis DSS tratados con CP por vía intrarrectal. La colitis se indujo con DSS al 2% y se trató con 50 o 100 µg / día de CP por vía intrarrectal (n=10 por grupo). Las células fueron aisladas y analizadas por citometría de flujo. Cantidad relativa de (A) neutrófilos, linfocitos CD4, linfocitos CD8 y (B) expresión de IFN-γ e IL-4 por linfocitos CD4 T. (C-E) Histogramas de positivos Ly6G en sangre periférica en los grupos control (C), DSS (D) y CP50 (E). Los valores son medias ± SEM. \*p<0,05 vs. grupo control; \*p < 0,05 vs. grupo DSS.

**Figura 8.** Efecto de CP sobre células epiteliales intestinales EC18. (A, B) Efecto sobre la secreción de GRO $\alpha$  y MCP-1. (C, D) Impacto de TLR4 *knockdown* sobre el efecto de CP en la secreción de GRO $\alpha$  y MCP-1. (E, F) Impacto de la inhibición farmacológica de NF $\kappa$ B (Bay11-7082, 10  $\mu$ M) y RAGE (FPS-ZM1, 10  $\mu$ M) sobre el efecto de CP en la secreción de GRO $\alpha$  y MCP-1. Se añadieron diferentes concentraciones de CP al medio de cultivo y la concentración de citoquinas en el medio de cultivo se midió empleando ELISA tras una incubación de 24 h. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes (n = 3 en cada experimento). \*p<0,05 vs. control; \*p<0,05 vs. grupo estimulado.

10

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones:

En el contexto de la presente invención, se definen los siguientes términos:

15

Calprotectina se define como un dímero de la proteína S100A8 o cualquier polipéptido cuya secuencia de ácidos nucleicos posee una identidad superior al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, al 99% o más con la secuencia de S100A8; y la proteína S100A9 o cualquier polipéptido cuya secuencia de ácidos nucleicos posee una identidad superior al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más con la secuencia de S100A9.

20

El término "dímero", como se emplea en este documento, se refiere a la asociación de dos subunidades.

25

El término "S100A8" se refiere al gen humano S100A8 (p. ej. Homo sapiens—GENBANK Accession No. NM.sub.—002964.4) y su producto génico (GENBANK Accession No. NP.sub.—002955.2), incluyendo productos salvajes (*wild type*) y mutantes. S100A8 también se conoce como MRP-8, "S100 calcium-binding protein A8", calgranulina A, calgranulin-A, subunidad de calprotectina L1L, antígeno de fibrosis quística, cadena ligera compleja de leucocitos L1, proteína relacionada con el factor inhibidor de migración 8 o "urinary stone protein band A")

30

La proteína S100A8 tiene la siguiente secuencia:

SEQ S100A8:

MLTELEKALNSIIDVYHKYSLIKGNFHAVYRDDLKKLLETCPQYIRKKGADVWFKELDI  
 NTDGAVNFQEFLLILVIKMGVAAHKKSHKEESHKE

El término "S100A9" se refiere al gen humano S100A9 (p. ej., Homo sapiens--GENBANK  
 5 Accession No. NM.sub.--002965.3) y su producto génico (GENBANK Accession No.  
 NP.sub.--002956.1), incluyendo productos salvajes (*wild type*) y mutantes. S100A9 se  
 conoce también como MRP-14, "S100 calcium-binding protein A9", calgranulina B,  
 calgranulin-B, subunidad de calprotectina L1H, cadena pesada compleja de leucocitos L1  
 o proteína relacionada con el factor inhibidor de migración 14 en humanos. Hay genes y  
 10 proteínas equivalentes (ortólogos) en diferentes especies de mamíferos como ratas y  
 ratones.

La proteína S100A9 tiene la siguiente secuencia:

SEQ S100A9:

15 MTCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLKKENKNEKVIE  
 HIMEDLDTNADKQLSFEEFIIMLARLTWASHEKMHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP

En cada caso, las secuencias S100A8 y S100A9 codifican preferentemente una proteína  
 que sobrerregula la fugetaxis. Más aún, los términos "gen S100A8/S100A9", "secuencia de  
 20 nucleótidos S100A8/ S100A9" y "secuencia de polinucleótidos S100A8/ S100A9" abarcan  
 las secuencias de ADN, ADN complementario (cADN) y ARN.

Los términos "fugetaxis" (o fugetaxia) y "anti-quimiotaxis" (o anti-quimiotaxia o quimiotaxia  
 reversa) se refieren a la respuesta de células móviles en la cual la dirección del movimiento  
 25 las aleja del gradiente de una sustancia diseminable o agente quimiocinético.

El término "secuencia de aminoácidos" para referirse a una secuencia de aminoácidos de  
 una molécula de proteína de origen natural, y términos similares tales como "polipéptido" o  
 "proteína", no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos  
 30 nativa completa, asociada con la molécula de proteína mencionada.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sustitución aminoacídica" se refiere  
 a un acto, proceso o resultado de la sustitución de aminoácidos.

El término "plasmido", tal y como se usa aquí, se refiere a un pequeño fragmento de ADN que se reproduce de forma independiente.

5 El término "purificado/a" se refiere a moléculas (polinucleótidos o polipéptidos) que se eliminan de su entorno natural, aisladas o separadas. Las moléculas "sustancialmente purificadas" están al libre menos del 50%, preferiblemente al menos del 75%, y más preferiblemente al menos del 90% de otros componentes con los que están asociados de forma natural.

10 El término "salvaje" ("wild-type") se refiere a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente natural. Un gen de tipo salvaje es el que se observa más frecuentemente en una población y por lo tanto se emplea arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo salvaje" del gen.

15 Los términos "mutante", "polimorfismo" y "variante", en referencia a un gen o producto génico, se refieren a alteraciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características diferentes) cuando se comparan con el gen de tipo salvaje o con un producto del gen parental. En algunas realizaciones preferidas, el término mutante se refiere a un gen o producto génico que difiere de un gen o producto génico parental como resultado de  
20 mutación. Se observa que los mutantes naturales e inducidos pueden aislarse; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas en comparación con el gen de tipo salvaje o producto génico parental. Además, los genes mutantes pueden ser producidos artificialmente (por ejemplo, mutagénesis dirigida a un sitio) o sintéticamente en el laboratorio. El término mutación se refiere a un cambio en el número, disposición o  
25 secuencia molecular de nucleótidos en una secuencia genética. En otras realizaciones, "mutación" se refiere a un cambio en el número, disposición o una secuencia de aminoácidos especificada de un péptido o una proteína.

30 Como se usa en el presente documento en referencia a una proteína, el término "modificada" se refiere a proteínas con cambios estructurales incluyendo cambios primarios, secundarios, terciarios, etc. Por lo tanto, el término "modificado" abarca, pero no se limita a deleciones, inserciones y sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, como resultado de la mutación), así como modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, acilación, proteólisis limitada, fosforilación, isoprenilación y oxidación.

Además, el término modificado abarca la sustitución de un aminoácido nativo por un residuo no estándar incluyendo, pero sin limitarse a, acetamidometilo, ácido aminohexanoico, ácido aminoisobutírico, betaalanina, ciclohexilalanina, D-ciclohexilalanina, e-acetil lisina, ácido gamma aminobutírico, Hidroxiprolina, nitro-arginina, nitro-fenilalanina, nitro-tirosina, 5 norleucina, norvalina, carboxilato de octahidroindol, ornitina, penicilamina, fenilglicina, fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, piroglutamato y tetrahidroisoquinolina.

El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Los anticuerpos policlonales que se forman en el animal como resultado de una reacción 10 inmunológica contra una proteína de interés o un fragmento de la misma, pueden ser fácilmente aislados de la sangre usando métodos bien conocidos y purificados, por ejemplo, por cromatografía en columna. Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse usando métodos conocidos (véase, por ejemplo, Winter y Milstein, Nature, 349, 293 - 299, 1991). Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos 15 preparados de forma recombinante y anticuerpos modificados así como fragmentos de unión a antígenos, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos multifuncionales, anticuerpos biespecíficos u oligo-específicos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos F(ab) o F(Ab).sub.2. El término "reactivo" usado en referencia a un anticuerpo indica que el anticuerpo es capaz de unirse a un antígeno de interés. Por 20 ejemplo, un anticuerpo reactivo con S100A8 es un anticuerpo, que se une a S100A8 o a un fragmento de S100A8.

Los términos "transportador", "adyuvante" y / o "vehículo" se refieren a entidades o sustancias moleculares con las que se administran los principios activos. Tales 25 transportadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, desgranados, agentes humectantes o diluyentes. Transportadores farmacéuticos, adyuvantes y / o vehículos farmacéuticos adecuados se describen, por 30 ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin.

Los términos "localizado" y "local" se refieren a la participación de un área limitada. Por lo tanto, en contraste con el tratamiento "sistémico", en el que está involucrado todo el cuerpo, usualmente a través de los sistemas vascular y / o linfático, el tratamiento localizado implica

el tratamiento de un área específica y limitada. Así, en algunas realizaciones, las zonas afectadas se tratan localmente usando los métodos y composiciones de la presente invención.

- 5 El término "tópicamente" significa aplicación a la superficie de la piel, mucosa, vísceras, etc. De manera similar, los términos "agente tópicamente activo" se refieren a una sustancia o composición que provoca una respuesta farmacológica en el sitio de aplicación (Por ejemplo, piel o epitelio intestinal).
- 10 Los términos "agente sistémicamente activo" se usan en sentido amplio para indicar una sustancia o composición que producirá una respuesta farmacológica en un sitio alejado del punto de aplicación.

15 El término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino *Animalia*, que incluye seres vivos que tienen células que difieren de las células vegetales con respecto a la ausencia de una pared celular y clorofila y la capacidad para el movimiento espontáneo. Las realizaciones preferidas de la presente invención se dirigen principalmente a mamíferos del reino animal.

20 Los términos "paciente" y "sujeto" se refieren a un animal, preferentemente mamífero, más preferentemente humano, que es candidato para recibir tratamiento médico.

25 Los términos "muestra" y "espécimen" se usan en su sentido más amplio. Por un lado, están destinados a incluir un espécimen o un cultivo. Por otra parte, se pretende que incluyan tanto muestras biológicas como ambientales. Estos términos abarcan todos los tipos de muestras obtenidas de seres humanos y otros animales, incluyendo, pero no limitados a, fluidos corporales tales como orina, sangre, materia fecal, líquido cefalorraquídeo, semen, saliva y exudados de herida, así como tejido sólido. Sin embargo, estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos de los tipos de muestras aplicables a la presente invención.

30 El término "inflamación", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la respuesta tisular al trauma, caracterizada por el aumento del flujo sanguíneo y la entrada de leucocitos en los tejidos, dando como resultado hinchazón, enrojecimiento, temperatura elevada y dolor.

El término "síntoma" se refiere a cualquier evidencia subjetiva de enfermedad o de estado de un paciente (por ejemplo, un cambio en la condición de un paciente indicativo de algún estado corporal o mental). Por ejemplo, la frase "síntomas de inflamación" en el contexto de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) se define aquí para incluir, pero no se limita a, síntomas tales como dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal, pérdida de peso, fiebre, pérdida de apetito, y otras complicaciones más graves, como la deshidratación, la anemia y la desnutrición. Varios de estos síntomas están sujetos a un análisis cuantitativo (por ejemplo, pérdida de peso, fiebre, anemia, etc.). Algunos síntomas se determinan fácilmente a partir de un análisis de sangre (por ejemplo, anemia) o un ensayo que detecta la presencia de sangre (por ejemplo, sangrado rectal).

El término "tratamiento" tal como se entiende en la presente memoria se refiere a combatir los efectos causados como resultado de una enfermedad o patología de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, más preferiblemente un ser humano). El "tratamiento" también incluye la prevención, la mejora o la eliminación de las secuelas fisiológicas de la enfermedad. Más específicamente, el tratamiento incluye:

- (I) prevenir la enfermedad o estado patológico en un mamífero, particularmente cuando el mamífero tiene pre-disposición por que la condición patológica ocurra, pero aún no se ha diagnosticado para tenerlo.
- (II) inhibir la enfermedad o estado patológico, es decir, detener su desarrollo;
- (III) aliviar la enfermedad o estado patológico, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o estado patológico o de sus síntomas;
- (IV) estabilizar la enfermedad o estado patológico.

Del mismo modo, la frase "en condiciones tales que los síntomas se reducen" en el contexto de la IBD se refiere a cualquier grado de reducción cualitativa o cuantitativa de los síntomas detectables de la IBD, incluyendo pero no limitado a, un impacto detectable en la tasa de recuperación de la diarrea, sangrado rectal, pérdida de peso, fiebre, pérdida del apetito, deshidratación, anemia, distensión, fibrosis, inflamación de los intestinos y desnutrición, o la reducción de al menos uno de los siguientes síntomas: dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal, pérdida de peso, fiebre, pérdida de apetito, deshidratación, anemia, distensión, fibrosis, inflamación intestinal y desnutrición.

**Uso de CP para el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias intestinales**

En un primer aspecto, la presente invención está relacionada con el uso de calprotectina, como se define previamente, para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por daño o degeneración epitelial intestinal, preferiblemente enfermedad o afección intestinal inflamatoria.

En una realización particular, la enfermedad o afección es colitis.

10 **Medicamentos para el tratamiento de enfermedades o afecciones intestinales inflamatorias**

Otro aspecto de la invención es el uso de una calprotectina como medicamento, o en la preparación de un medicamento, para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por daño o degeneración epitelial intestinal, preferiblemente enfermedad o afección intestinal inflamatoria.

Otro aspecto es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de calprotectina y al menos un vehículo, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, útil para el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por daño o degeneración epitelial intestinal, preferiblemente enfermedad o afección intestinal inflamatoria.

En un aspecto particular, el único ingrediente activo comprendido en la composición es la calprotectina.

En un aspecto particular, la composición es adecuada para ser administrada localmente. En otro aspecto particular, la composición es adecuada para ser administrada tópicamente.

En otro aspecto particular, la composición es adecuada para administrarse por vía oral.

En un aspecto preferido, la composición debe administrarse intrarrectalmente, es decir, la composición comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable útil para una administración intrarrectal.

En un aspecto particular, el vehículo usado en la composición intrarrectal es  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM en agua destilada.

5 En otro aspecto particular, se puede usar un vehículo que impida o limite la destrucción o desnaturalización de CP en secreciones gástricas usando recubrimiento entérico tal como recubrimiento basado en eudragit L.

En una realización particular, la enfermedad o afección es colitis.

10 **Método de tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias intestinales**

Un aspecto más de la invención es un método, en adelante el "*método de la invención*", para tratar a un mamífero, preferiblemente humano, contra enfermedades o afecciones mediadas por daño o degeneración epitelial intestinal, preferiblemente enfermedad o  
15 afección intestinal inflamatoria, que comprende la administración, preferiblemente administración oral, más preferentemente de administración intrarrectal, de una cantidad terapéuticamente eficaz de calprotectina a dicho mamífero..

En un aspecto particular, el método de la invención comprende la administración local de  
20 una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de calprotectina. En otro aspecto particular, el método comprende una administración tópica de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de calprotectina.

En una realización particular, el método de la invención comprende:

- 25       A) proporcionar una composición que comprende calprotectina; y  
          B) poner en contacto el epitelio intestinal con dicha composición

En una realización más particular, la composición que comprende calprotectina es administrada por la vía intrarrectal.

30

En una realización particular, la enfermedad o afección es colitis.

Contrariamente a evidencias anteriores, como las mencionadas en la patente US [US20090305985], CP no es eficaz cuando se administra sistémicamente (por ejemplo,

usando la vía intraperitoneal). Más bien, la protección contra la colitis experimental se alcanza sólo cuando la misma cantidad de CP se administra por la vía intrarrectal, de forma que ejerce fundamentalmente una acción local sobre la mucosa inflamada. Este modo de acción es consistente con los mecanismos descritos para esta proteína, y además se ha demostrado específicamente que CP puede modular la biología epitelial actuando desde el dominio apical (luminal), aunque no se pueden excluir sitios de acción alternativos. Como se ha indicado, CP como tal no se ensayó in vivo en la patente US [US20090305985], ni se ensayó in vitro en experimentos quimiotácticos.

10 Un mecanismo local también es compatible con la dosificación oral, siempre que se administre CP en dosis suficientemente grandes y/o en formas galénicas adecuadas.

Basándose en los mecanismos descritos para CP, tradicionalmente se le ha atribuido un papel proinflamatorio. Sin embargo, el papel del CP en la inflamación es controvertido. Así, mientras el CP intramucoso puede actuar como alarmin y quimioatrayente, estudios recientes sugieren que el papel predominante del CP o sus subunidades heterodímeras puede ser en última instancia, antiinflamatorio [Hiroshima Y, Hsu K, Tedla N, et al. *S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury*. J Immunol. 2014;192:2800-2811] [Averill MM, Barnhart S, Becker L, et al. *S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation*. Circulation. 2011;123:1216-1226], [Geczy CL, Chung YM, Hiroshima Y. *Calgranulins may contribute vascular protection in atherogenesis*. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society. 2014;78:271-280]. La situación se complica por las características particulares del intestino, donde la activación inmunitaria realmente puede resultar en protección contra la inflamación. Así, aunque la ligadura de TLR4 provoca la activación celular en las células inmunitarias y epiteliales, también modula la dinámica epitelial para hacer frente al desafío impuesto por la inflamación de la mucosa, en la que la proliferación epitelial y la restitución son consideradas como importantes para la cicatrización y protección frente a la ulceración, una de las principales características de las IBD. De hecho, los ratones TLR4 KO muestran colitis elevada. De manera similar, el bloqueo de RAGE (otro un receptor de CP) atenúa la colitis, pero los ratones RAGE KO no son menos sensibles a la inducción de la colitis.

## MODOS DE REALIZACIÓN

## Materiales y métodos

### Reagentes

5 Excepto donde se indica, todos los reactivos y cebadores se obtuvieron de Sigma. La transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el Kit iScript cDNA Synthesis, y para la amplificación (Bio-Rad) se utilizó iTM SYBR Green Supermix. Los kits de ELISA para ratón se obtuvieron de eBioscience. El DSS se obtuvo de MP Biomedicals.

### 10 Calprotectina

La expresión y purificación de CP se realizó utilizando una versión modificada del protocolo original descrito en Kehl-Fie et al (2011). Brevemente, las proteínas S100A8 y S100A9 se sobreexpresan en células BL21 rosetta de *E. coli* en cuerpos de inclusión. La proteína se desdobra en clorhidrato de guanidinio y se redobla por diálisis a 4°C en un tampón que  
15 contiene fosfato 20 mM a pH 7,5. La purificación implica una serie de etapas cromatográficas que implican intercambio de aniones de hidroxilapatito, Source Q y columnas Superdex 75. Los lipopolisacáridos se eliminaron usando el kit de eliminación de endotoxinas ToxinEraser™ (Genscript) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 20 Animales

Los ratones hembra C57BL/6 se obtuvieron del Laboratorio Jackson y se mantuvieron en el Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada (Granada, España), en locales con aire acondicionado con un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad. Los animales fueron alojados por grupos en condiciones específicas sin patógenos (*Specific Pathogen-Free*, SPF), en jaulas individuales ventiladas con un sistema de insuflación de aire y exhalación con filtro doble (filtro previo y filtro HEPA) y se les dio acceso libre al agua del grifo y al alimento en autoclave (Harlan-Teklad 2014, Harlan Ibérica, Barcelona, España).  
25 Todos los procedimientos animales llevados a cabo en el presente estudio estaban de acuerdo con la Directiva para la Protección de Animales Vertebrados Utilizados para Fines Experimentales y otros Propósitos Científicos de la Unión Europea (86/609 / CEE) y fueron  
30 aprobados por el Comité de Bienestar Animal del Universidad de Granada.

### Inducción de colitis DSS y diseño experimental.

Se usaron un total de 67 ratones hembra C57BL/6. La colitis se indujo mediante la adición de DSS al agua potable durante 8 días. Se seleccionaron las condiciones experimentales para lograr un grado leve a moderado de colitis utilizando 2% p/v de DSS. El estado de los ratones se monitorizó individualmente mediante un examen general y midiendo la pérdida de peso corporal. Además, se observó la presencia de diarrea y hematoquecia. La ingesta de alimentos y el consumo de agua se controlaron todos los días. En el primer experimento, los ratones fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos diferentes. El grupo de control (C) (n = 10) no recibió DSS en ningún momento. Los ratones restantes bebieron agua suplementada con DSS y recibieron adicionalmente por vía intrarrectal 50 µg / d de calprotectina (grupo CP50, n = 10), 100 µg / d (grupo CP100, n = 10) o vehículo (β-mercaptoetanol 10 mM En agua destilada, grupo DSS, n = 10). La administración de calprotectina comenzó al mismo tiempo que la suplementación de DSS (día 0) y continuó hasta que los ratones se sacrificaron en el día 8 por dislocación cervical.

En un experimento separado, 27 ratones se asignaron aleatoriamente a un grupo control y un grupo DSS como se ha descrito anteriormente (n = 9), más un grupo, CP, que recibió 50 µg / d por vía intraperitoneal. El grupo DSS se inyectó diariamente con vehículo. Los animales se siguieron durante 8 días y se sacrificaron en las mismas condiciones.

#### 20 **Evaluación del daño en el colon.**

El colon completo se retiró, se enjuagó suavemente con solución salina y se colocó en una placa helada, se limpió de grasa y mesenterio y se secó sobre papel de filtro. Se pesó cada espécimen y se midió su longitud con una carga constante (2 g). Se diseccionó un segmento pequeño del intestino y se usó para aislar el ARN. El colon se cortó posteriormente longitudinalmente en varias piezas para la determinación de parámetros bioquímicos. Los fragmentos se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su uso. El tejido colónico fijado con formalina se cortó y se tiñó con hematoxilina y eosina. La histología se puntuó en una escala de 0-8 según los siguientes criterios: erosión (0-2); Infiltración (0-2); Pérdida de la estructura de las criptas (0-2); Espesamiento submucoso (0-2). Las actividades de mieloperoxidasa de colon (MPO) y de fosfatasa alcalina (AP) se midieron espectrofotométricamente como se ha descrito. Además, se midió la sensibilidad de AP al inhibidor específico levamisol *in vitro*.

#### **Immunohistoquímica.**

El tejido colónico fijado con formalina se deparafinizó en xileno y se rehidrató a través de una serie de tratamientos con alcohol. La recuperación del antígeno se logró hirviendo las matrices en tampón de citrato de sodio (pH 6,0). La actividad de HRP endógena se bloqueó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,5%. Después de bloquear en suero de caballo normal al 10%, se aplicó el anticuerpo MRP-8 (ab92331, Abcam) y la señal se detectó utilizando el kit VECTASTAIN Elite ABC (Vectashield, PK-6100). Se añadieron AEC (3-amino-9-etilcarbazol) y las muestras se desarrollaron durante tres a cinco minutos. La reacción se terminó colocando los portaobjetos en agua destilada. Las láminas fueron entonces contracoloradas con Hematoxilina Harris. Los tejidos se montaron entonces usando medio de montaje acuoso.

10

### **Secreción de citocinas por células de nódulos linfáticos mesentéricos y esplenocitos.**

Se extrajeron los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) y el bazo de los ratones usando una técnica estéril y se diseccionaron mecánicamente. Las células se lavaron una vez con medio fresco y se filtraron usando un filtro de 70 µM (colador de células BD Falcon, Referencia 352350, Becton Dickinson) para obtener una suspensión mononuclear, en su mayor parte de células T. Las células se incubaron en medio RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal (10%), 2 mM de L-glutamina, 100 U / ml de penicilina, 0,1 mg / ml de estreptomina, 2,5 mg / ml de anfotericina B y 0,05 mM de β-mercaptoetanol. Las células se cultivaron a 10<sup>6</sup> células / ml y se estimularon con concanavalina A (ConA) a una concentración final de 5 mg / ml. ConA es un estimulante policlonal de células T que evoca un aumento en la secreción de citocinas, que es típicamente mejorada en animales colíticos. El medio de cultivo celular se recogió después de 48 h y se ensayó el contenido de citoquinas mediante ELISA comercial. Las citoquinas ensayadas fueron IL-6, IL-10, IL-17, IFN-γ y TNF-α. Las placas (placa Nunc™ Inmuno) se leyeron a 450 nm usando un lector de placas (Tecan, modelo Sunrise-basic). La medición de ELISA de citoquinas en sobrenadantes de células no mostró una tendencia consistente en el caso de IFN-γ, TNFα e IL6 (datos no mostrados).

20  
25  
30

### **Citometría de flujo.**

Las suspensiones de células individuales de esplenocitos recién aislados se lavaron en tampón de tinción (FBS al 5% / NaN<sub>3</sub> al 0,02% en PBS), se bloquearon con anticuerpo anti-CD16 / 32 durante 5 min a temperatura ambiente (RT) y luego se tiñeron durante 30 min a 4°C con los siguiente anticuerpos de superficie: anti-CD3 APC, anti-CD4 PerCP, anti-CD8

FITC, anti-Ly6G PE-Cy7 (BD Pharmingen). Las suspensiones celulares se lavaron y se analizaron utilizando un citómetro de flujo FACsCalibur (BD Biosciences) y el software FlowJo (Versión 9.3.1, Treestar).

5 Para la estimulación in vitro de esplenocitos aislados se cultivaron células en medio completo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (v/v), L-glutamina 2,0 mM, 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M, penicilina 100 U / ml y estreptomycin 100  $\mu$ g/ml, más acetato de miristato de forbol (0,5  $\mu$ g / ml), ionomicina (2,5  $\mu$ g / ml) y monensina 2  $\mu$ M (GolgiStop®), que se añadieron simultáneamente al comienzo del cultivo celular. Las  
 10 muestras se incubaron durante 4 h a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, después las células se tiñeron durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos: anti- IFN- $\gamma$  PE y anti-IL-4 APC. Después se lavaron las suspensiones celulares y se siguió el procedimiento extracelular estándar para anti-CD3 FITC y anti-CD4 PerCP.

#### 15 **Cultivo de células epiteliales intestinales**

Epitelios de intestino delgado de rata no modificada IEC18 (ECACC 88011801) (pasajes 25-50) se obtuvieron del Servicio de Cultivo Celular de la Universidad de Granada y se cultivaron en DMEM que contenía suero bovino fetal (10%), 100 U/ml de penicilina, 0,1 Mg/ml de estreptomycin y 2,5 mg/ml de anfotericina B. Todos los experimentos se  
 20 realizaron con monocapas 2-5 días después de alcanzar la confluencia. Las células IEC18 fueron pretratadas en algunos experimentos con shRNA específico para TLR4 para genes knockdown. Todos los reactivos utilizados en estos experimentos se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Alemania) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células IEC18 se sembraron en placas de seis pocillos y se cultivaron  
 25 durante 24 h hasta el 50% de confluencia. Antes de la infección, el medio IEC18 se suplementó con polibreno 5  $\mu$ g/mL y las células se incubaron durante 10 h. las partículas control y TLR4 shRNA lentiviral también fueron pretratadas por separado con polibreno 5  $\mu$ g/mL durante 30 min, añadido al medio de cultivo e incubado durante la noche. Al tercer día, se sustituyó el medio fresco por partículas lentivirales que contenían medio y las células  
 30 se cultivaron hasta confluencia durante 24 h. Finalmente, las células IEC18 se dividieron (1:5), se cultivaron de nuevo durante 24 h y se seleccionaron con 10  $\mu$ g/ml de diclorhidrato de puromicina.

Con el fin de explorar las vías de señalización, monocapas confluentes de IEC18 fueron expuestas a Bay 11-7082 (10  $\mu$ M), un inhibidor selectivo de fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  que bloquea la vía de señalización NF $\kappa$ B, o a FPS-ZM1 (10  $\mu$ M) (Merck Millipore, Billerica, MA), un antagonista de RAGE. Todos los inhibidores se disolvieron en DMSO y se añadieron al medio de cultivo 2 h antes de la exposición.

### **Análisis estadístico.**

En todos los experimentos, las muestras se tomaron por triplicado, y los resultados se expresan como medias con sus errores estándar (SEM). Las diferencias entre las medias se testaron usando ANOVA de una vía para ver su la significación estadística y se realizaron tests de diferencia mínima significativa de Fisher a posteriori sobre pares preseleccionados. Todos los análisis se realizaron con el programa SigmaStat 3.5 (Jandel Corporation). Las diferencias se consideraron significativas con  $P < 0,05$ .

### **Resultados**

Los ratones tratados con DSS (ratones DSS) exhibían signos clásicos de colitis incluyendo pérdida de peso corporal a partir del día 5 en adelante, diarrea y sangrado rectal, además de una apariencia general “enferma” (comportamiento de acurrucación, movimientos reducidos, pelo erecto) (Figure 1A. Datos no mostrados). El intestino grueso era hiperémico, engrosado y rígido, con pérdida del patrón vascular de la mucosa, resultando en un aumento significativo en la puntuación del daño colónico (Figura 1B / C / D). A nivel histológico, la inflamación del colon se caracterizó por una estructura anormal de la cripta y la pérdida de criptas, la infiltración de leucocitos (es decir, neutrófilos), la ampliación de la submucosa, etc. (Figura 2), resultando en una puntuación significativamente mayor (Tabla 1). Los ratones con colitis mostraron un aumento en la actividad de AP colónica, un indicador de estrés epitelial e inflamación, asociada con una sensibilidad in vitro aumentada al inhibidor específico levamisol (Figura 3). La colitis inducida por DSS también se asoció con un aumento en los marcadores de neutrófilos MPO y S100A8 (Figura 4). El análisis inmunohistoquímico reveló que las células portadoras de S100A8 estaban infiltrando la mucosa y submucosa, sin expresión al nivel epitelial (Figura 4C). La colitis se asoció también con esplenomegalia (Figura 1E).

Los ratones tratados con CP mostraron una pérdida de peso corporal reducida en comparación con el control DSS, que fue significativa sólo para el grupo C50 el último día

(Figura 1<sup>a</sup>). La CP no tuvo efecto sobre el peso del colon: relación de longitud (Figura 1B). La puntuación de daño macroscópico se redujo a la mitad con ambas dosis de CP en comparación con el grupo DSS, pero esto no logró alcanzar significación estadística (Figura 1D). También se observó una mejora dependiente de la dosis de la puntuación microscópica (significativa sólo con la dosis más alta, Tabla 1), correspondiente a la preservación de la estructura mucosa, particularmente a nivel epitelial (Figura 2). La actividad de MPO se normalizó completamente con la dosis de 50 µg/día y estaba realmente por debajo del control no inflamado cuando se administró CP a 100 µg/día (Figura 4A). Resultados comparables se observaron con S100A8 (Figura 4B / C). De manera similar, la actividad de AP colónica y la sensibilidad a levamisol fueron generalmente menores en ambos grupos tratados, aunque sólo con la dosis de CP más baja se logró la significancia (Figura 3). El tamaño del bazo se redujo significativamente con la mayor dosis de CP (Figura 1E).

	Erosión	Infiltración	Pérdida de la estructura de las criptas	Espesamiento submucoso	Puntuación Total
Control	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
DSS	1,2 ± 0,3	1,3 ± 0,3	1,3 ± 0,4	0,3 ± 0,2	4,0 ± 1,0 <sup>+</sup>
CP 50	0,6 ± 0,3	1,1 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,1 ± 0,1	2,5 ± 0,8 <sup>+</sup>
CP 100	0,5 ± 0,2 <sup>*</sup>	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0 ± 0	2,1 ± 0,4 <sup>**</sup>

Tabla 1. Puntuación histológica de ratones DSS tratados con Calprotectina a 50 µg/d, 100 µg/d vía intrarrectal; o vehículo. <sup>+</sup>p<0,05 vs. grupo control; <sup>\*\*</sup>p<0,05 vs. grupo DSS.

Con el fin de dilucidar en profundidad el efecto beneficioso de la CP se analizó la expresión colónica de una amplia gama de genes que se sabe que se expresan diferencialmente en fase aguda de colitis inducida por DSS y que están al menos en parte asociados con la enfermedad inflamatoria intestinal humana. Se observó una fuerte regulación de la expresión colónica de citoquinas, incluyendo IL-10, TNF $\alpha$ , IL-4 y IFN- $\gamma$ , (Figura 5). Además, los niveles de mRNA de colon del marcador de células T reguladoras Foxp3 y el péptido antibacteriano Reg3 $\gamma$  también aumentaron marcadamente (p> 0,05 para este último). Debe observarse que la alta variabilidad en el grupo DSS impidió alcanzar la significación estadística frente al grupo control en algunos casos (IL-22). La CP provocó una reducción de la expresión de estos marcadores inflamatorios, que fue significativa para TNF $\alpha$ , IL-10, Foxp3, Reg3 $\gamma$  e IFN- $\gamma$  en una o ambas dosis. Los niveles de mRNA de IL-22 también

fueron más bajos que en el grupo DSS, pero sin alcanzar significación estadística. Como la CP se ha descrito como un ligando TLR4, también se midió su expresión (Figura 5C). No hubo efecto de la colitis DSS en este parámetro, pero ambas dosis de tratamiento con CP redujeron significativamente sus niveles de mRNA.

5

Por otro lado, con el fin de evaluar el estado inmunológico dentro del ambiente intestinal, se cultivaron esplenocitos de ratón y MLNCs *ex vivo*, ya sea en presencia o ausencia del estimulador de células T ConA. El nivel de IL-17A se redujo significativamente en los grupos que recibieron CP cuando los esplenocitos (Figura 6A) y MLNCs (Figura 6C) fueron expuestos a ConA. Por el contrario, la producción de IL-10 no se alteró ni en esplenocitos ni en MLNC bajo estimulación con ConA (Figura 6B / D). A su vez, la liberación basal de IL-10 se redujo en esplenocitos de ratones tratados con CP, mientras que la de MLNC permaneció sin cambios (Figura 6C). La medición de ELISA de citoquinas en sobrenadantes de células no mostró una tendencia consistente en el caso de IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL6 (datos no mostrados).

10  
15

Finalmente, los esplenocitos y las células sanguíneas periféricas completas se analizaron por citometría de flujo. La colitis inducida por DSS se asoció con un marcado aumento de los niveles de neutrófilos en sangre, que se redujo en los grupos de CP (Figura 7A). No hubo cambios significativos en el número de linfocitos CD4 y CD8. En el bazo, la CP aumentó, de forma dosis-dependiente, el número de ambas células CD4+ IL-4+ e IFN- $\gamma$ +, aunque esto no se vio afectado por la colitis DSS (sólo fue significativo para la dosis de 100  $\mu$ g, Figura 7B).

20

### 25 **Ensayos realizados para demostrar un efecto sistémico**

Con el fin de verificar los posibles efectos sistémicos de la CP se realizó un segundo experimento en el que la calprotectina se administró por vía intraperitoneal a ratones con colitis inducida por DSS (ratones DSS) siguiendo un protocolo idéntico al anterior. Como se muestra en la Tabla 2, no hubo ningún efecto de CP en estas condiciones experimentales, excepto por un peso del bazo ligeramente más alto.

30

	Razón Longitud/Peso (mg/cm)	Actividad de AP colónica (mU/mg)	Porcentaje del peso inicial	Peso del bazo (mg)	Actividad de MPO colónico (mU/mg prot)
Control	20,2 ± 1,2	98,8 ± 8,8	102,2 ± 1,3	681,7 ± 26,2	227,6 ± 44,5
DSS	33,1 ± 1,2	318,5 ± 27,6	78,8 ± 1,0	697,7 ± 33,9	746,3 ± 95,5
CP i.p.	32,0 ± 1,3	265,4 ± 21,0	80,2 ± 1,3	806,7 ± 39,6	713,4 ± 86,4

Tabla 2. Efecto de la calprotectina en ratones con colitis inducida por DSS. La colitis se indujo en ratones con DSS al 2.5% en agua de bebida. Los ratones DSS fueron tratados con calprotectina a 50 µg/d por vía intraperitoneal (i.p.) o vehículo.

#### 5 **Efecto de CP en células epiteliales *in vitro***

Adicionalmente, se examinó el efecto de la CP en las células epiteliales intestinales *in vitro*. Se utilizaron células IEC18, una línea celular no tumoral. Como era de esperar, estas células mostraron una producción mínima de citoquinas en condiciones basales, pero liberaron cantidades marcadamente aumentadas de GRO $\alpha$  y MCP1 cuando se estimularon con LPS (Figura 8). La CP produjo una secreción sustancial de citoquinas a 10 µM (equivalente a 360 µg/mL). Dado que se ha descrito que la CP actúa vía ligadura de TLR4 y RAGE, se evaluó el impacto de la interferencia del receptor usando genes knockdown y un antagonista específico, respectivamente. Como era de esperar, el silenciamiento de TLR4 resultó en la inhibición significativa de secreción de citoquinas provocadas por LPS, pero no tuvo ningún efecto sobre la evocación de la secreción de GRO $\alpha$ , mientras que la de MCP-1 se realizó (Figura 8 C / D). A su vez, el antagonista de RAGE, FPS-ZM1, eliminó casi completamente la secreción de GRO $\alpha$  / MCP-1 provocada por CP o LPS (que es también un ligando de RAGE). Se obtuvieron efectos similares con el inhibidor de NF $\kappa$ B, Bay11-7082 (Figura 8E/F).

20

#### **Resumen de los resultados de los ensayos**

Los resultados presentados demuestran que la CP exógena ejerce efectos protectores en la colitis inducida por DSS en ratones. Con el fin de obtener beneficios terapéuticos, la CP

debe administrarse intrarrectalmente, ya que la actividad se perdió completamente cuando se administró por vía intraperitoneal. Aunque no se dispone de datos farmacocinéticos, las proteínas, incluidas las grandes, como los anticuerpos, normalmente se absorben eficientemente cuando se inyectan por vía subcutánea y se espera que sigan un comportamiento similar con la vía intraperitoneal.

La principal fuente de CP en la colitis inducida por DSS son presumiblemente los neutrófilos infiltrados, que se reclutan con avidez para activar las lesiones mucosas activas tanto en la colitis experimental como en los pacientes con IBD, ya que expresan grandes cantidades de la proteína. Esto es consistente con el análisis inmunohistoquímico y los niveles elevados de MPO en el tejido, otra proteína neutrófila predominante, usada universalmente como un marcador de inflamación intestinal, como en el presente estudio. La inflamación intestinal continua se asocia con el aumento de los niveles de CP fecales, como se mencionó anteriormente, pero no está claro exactamente cómo la proteína accede al lado luminal. Los neutrófilos son capaces de realizar una migración transepitelial, dando lugar a abscesos de cripta y, finalmente, también a la presencia de neutrófilos en el lumen intestinal. Estas son, por lo tanto, una fuente plausible de CP fecal. De hecho, las heces de pacientes con IBD activa muestran niveles aumentados de varias proteínas de neutrófilos. Los macrófagos activados también pueden contribuir al aumento de la CP luminal. También es posible que las CP de la mucosa se puedan filtrar a través del epitelio hacia el lumen, aunque este mecanismo no se ha establecido. Además, cabe señalar que aunque tradicionalmente se consideró que el epitelio intestinal no expresaba CP, recientemente se ha demostrado que produce S100A8 y/o S100A9. Por lo tanto, esto puede ser una posible fuente adicional de CP fecal. Sin embargo, Holgersen et al. No observó tinción epitelial con anti-S100A8 en ratones colíticos IL-10 KO, y nuestros propios datos no respaldan la expresión epitelial de S100A8 en colitis inducida por DSS.

Por lo tanto, se espera que la CP administrada intrarrectalmente actúe principalmente, o incluso exclusivamente, en el lumen colónico. Dado que el presente estudio fue diseñado como un experimento de prueba de concepto, tenemos poca evidencia directa de los mecanismos que explican el efecto beneficioso observado. Sin embargo, sobre la base de las propiedades conocidas de la CP podemos especular sobre varias posibilidades. En primer lugar, la CP puede ejercer acciones antibacterianas, posiblemente en áreas cercanas al epitelio o en sitios de lesión epitelial con translocación bacteriana. Esto se ha

identificado como un factor patógeno relevante en la IBD y la colitis experimental, de modo que se espera que la protección contra la penetración bacteriana y/o el daño a la barrera epitelial sea beneficiosa para el huésped. También es concebible un posible impacto sobre la composición de la microbiota, pero esta posibilidad no ha sido explorada hasta el momento. En segundo lugar, la CP puede actuar como un antioxidante en las áreas mucosas dañadas. En tercer lugar, la CP puede modular la función de las células epiteliales, por ejemplo mediante la activación de TLR4 apical o receptores RAGE.

Los resultados *in vitro* indican que la CP evoca la secreción de citoquinas por las células IEC18, una línea de células epiteliales intestinales de rata. Esto también se observó en células epiteliales intestinales de ratón (células IEC4.1, datos no mostrados). El efecto se alcanzó a concentraciones relativamente altas (10  $\mu$ M). Sin embargo, esta concentración probablemente se alcanza *in vivo* con las dosis ensayadas. Como un colon del ratón completamente distendido contiene ~ 0,3 ml, una dosis intrarrectal de 100  $\mu$ g/día resultaría en una concentración de al menos 333  $\mu$ g / ml. Nuestros datos indican además que la CP evoca la secreción de citoquinas a través de RAGE ligadura y la activación de NF $\kappa$ B. TLR4 no estuvo involucrado en la liberación de GRO $\alpha$ , pero parece ejercer una acción inhibitoria sobre la producción/secreción de MCP-1. Aunque las consecuencias de la secreción de citoquinas evocadas por células epiteliales aumentadas son discutibles, es importante notar que los ratones GRO $\alpha$  KO son más sensibles a la colitis DSS. Nuestros datos también indican que la CP activa macrófagos *in vitro* (datos no presentados), en consonancia con los informes anteriores. Este no puede ser el único mecanismo de la CP en el nivel epitelial, ya que la evidencia preliminar obtenida por análisis de microarrays de células Caco 2 expuestas a CP sugiere que un conjunto de genes relacionados con la unión estrecha y unión epitelial está sobrerregulada, un efecto que es coherente con la protección contra la inflamación (datos no mostrados).

También es interesante observar que el bazo y las células mononucleares de nódulo mesentérico aisladas de ratones tratados con CP exhiben una producción de IL-17A regulada negativamente, mientras que los niveles de IL-10 permanecieron estables, es decir, similares a los del grupo de control DSS. La IL-10 es una citoquina antiinflamatoria importante en diferentes órganos incluyendo el intestino, y los ratones IL-10 KO desarrollan colitis crónica espontáneamente. La IL-10 se regula positivamente en la colitis crónica y tiende a disminuir a medida que la reacción inflamatoria disminuye. Además, IL-10 se

correlaciona con los niveles de colon de FOXP3, que es un marcador de células Treg, uno de los principales productores de IL-10. Se ha descrito recientemente el uso de CP para proteger contra la inflamación pulmonar por inducción de IL-10. Por lo tanto, es plausible que este también sea un mecanismo operativo en la colitis DSS.

5

Es interesante considerar la importancia biológica de las dosis ensayadas. Suponiendo un nivel fecal CP de ~ 50 µg/g como límite superior normal en humanos, la cantidad de CP en el lumen colónico en ratones no colícticos sería de aproximadamente 20 µg, ya que la producción fecal normal en ratones es de aproximadamente 0,4g/día. Por lo tanto, las dosis

10

ensayadas en nuestro estudio corresponden a niveles luminales superiores a los normales, y probablemente están en el rango de los medidos en colitis en humanos. Esto plantea la posibilidad de que la CP "fisiológica" pueda tener un papel limitante en la respuesta colíctica. A este respecto, es interesante considerar la evidencia disponible con ratones KO S1008 / S100a9. Los ratones K0 S100a8 no son viables y mueren antes del nacimiento. Los ratones

15 S100a9 son por el contrario viables y aparentemente normales, aunque carecen de heterodímeros S100A8 / S100A9 (es decir, CP). El impacto de la ausencia de CP en la biología de neutrófilos no se resuelve, con casi cualquier efecto detectado en un estudio y la reducción de la respuesta quimioattractante y la expresión de CD11b en otro. Los efectos in vivo también son controvertidos, sin diferencias observadas en los modelos de peritonitis,

20 inflamación de la piel e infección del tracto urinario, mientras que una mayor susceptibilidad de los ratones K0 S100a9 a la formación de edema después de la infección de la pata con Leishmania y la reparación tisular deteriorada después de la lesión isquémica-reperfusión renal Observado. Desafortunadamente, no hay informes sobre los efectos sobre la colitis experimental.

20

25

En conclusión, nuestros datos indican que la calprotectina ejerce efectos protectores en la colitis experimental cuando se da por la vía intrarrectal, lo que sugiere un posible papel beneficioso similar en los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Se requiere una mayor experimentación para explorar los aspectos mecánicos y terapéuticos de este efecto.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de calprotectina, un dímero de la proteína S100A8 o cualquier polipéptido cuya secuencia de ácidos nucleicos posee una identidad superior al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, al 99% o más con la secuencia de S100A8; y la proteína S100A9 o cualquier polipéptido cuya secuencia de ácidos nucleicos posee una identidad superior al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más con la secuencia de S100A9, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección medidas por el daño o degeneración del epitelio intestinal.
- 10 2. Una composición según reivindicación anterior, adecuada para ser administrada tópicamente.
- 15 3. Una composición según cualquier de las reivindicaciones anteriores, adecuada para ser administrada por vía intrarrectal.
- 20 4. Una composición según cualquier de las reivindicaciones anteriores, donde la calprotectina es un dímero de las proteínas humanas S100A8 y S100A9.
5. Una composición según cualquier de las reivindicaciones anteriores donde el único principio activo es de la composición es calprotectina.
- 25 6. Una composición según cualquier de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias intestinales.
- 30 7. Una composición según cualquier de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento de colitis.

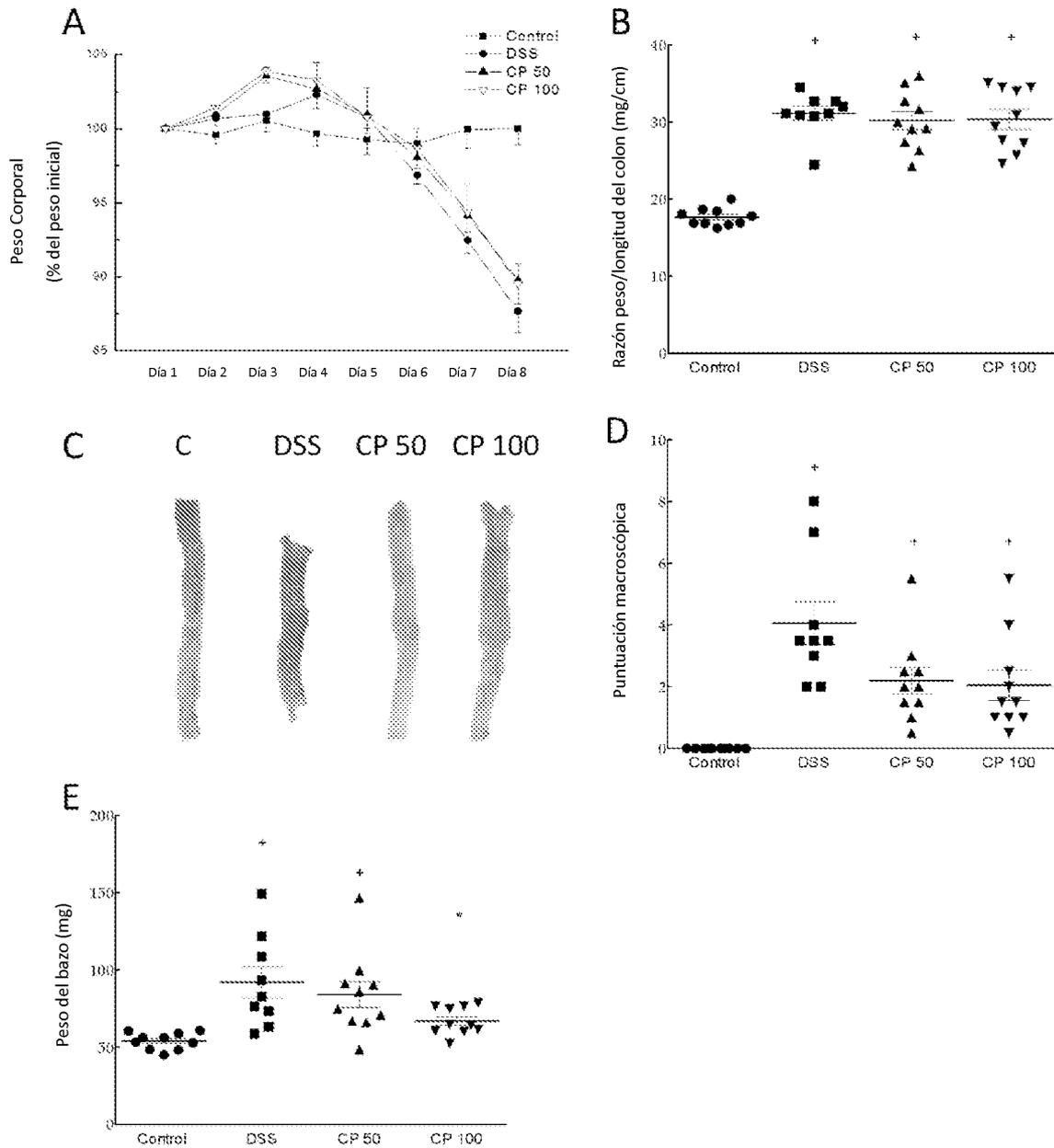


Fig. 1

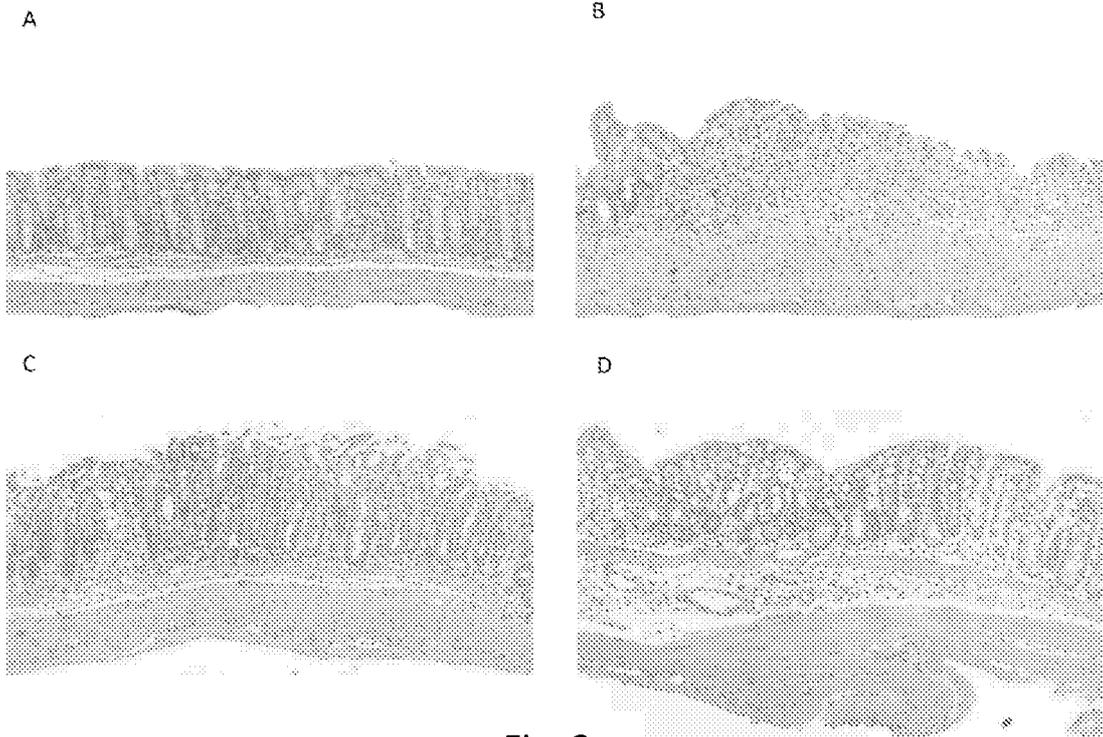


Fig. 2

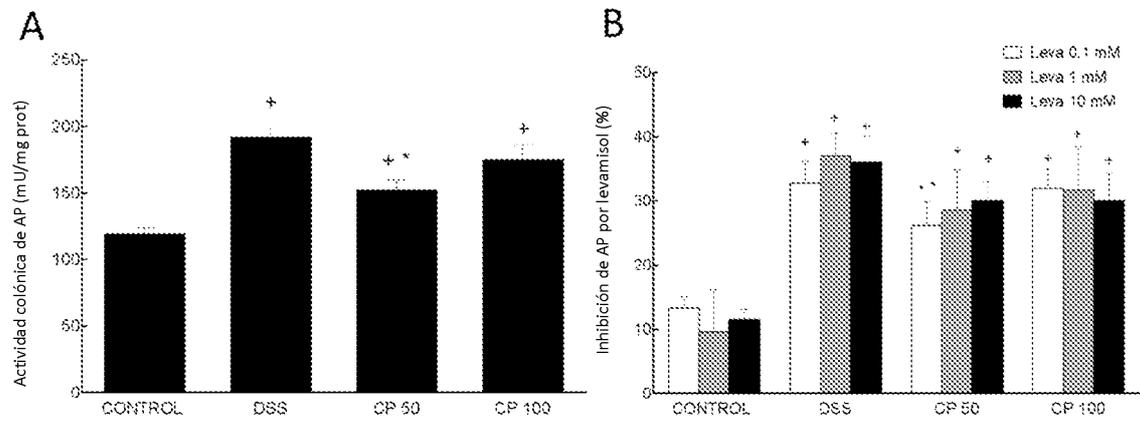


Fig. 3

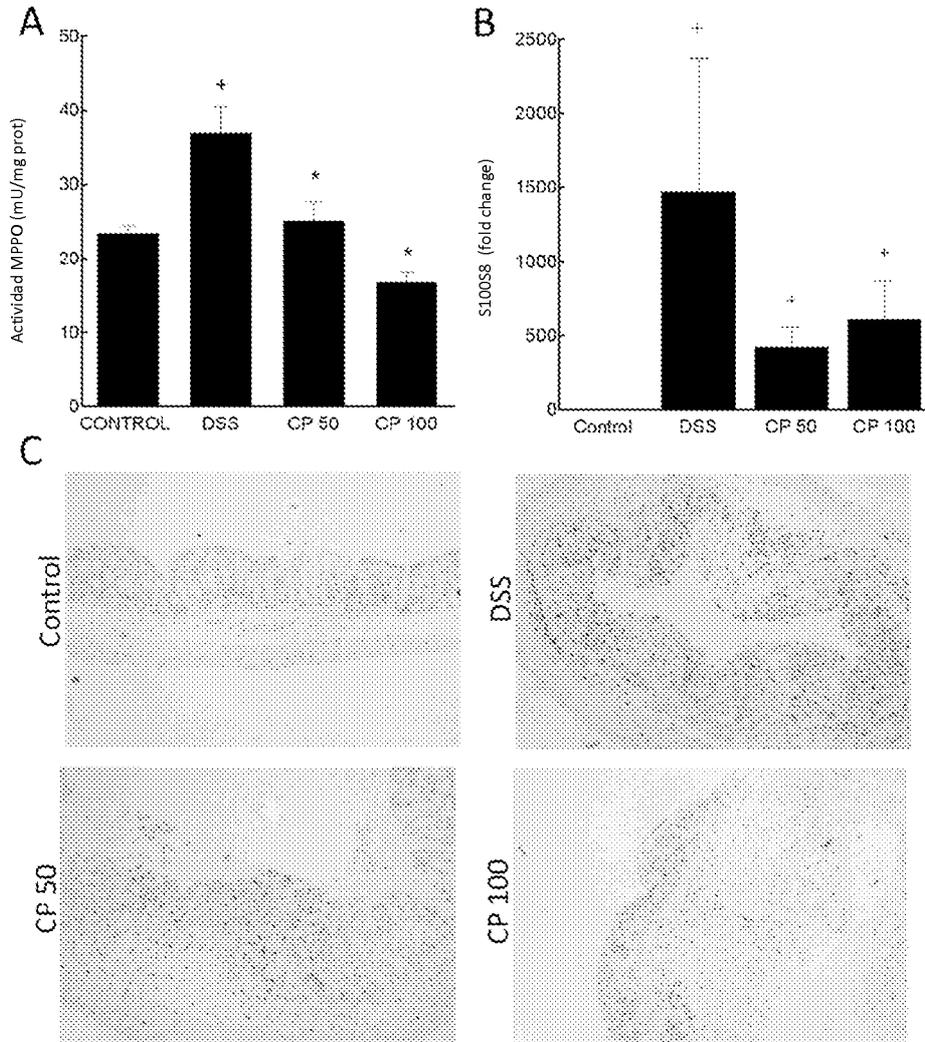


Fig. 4

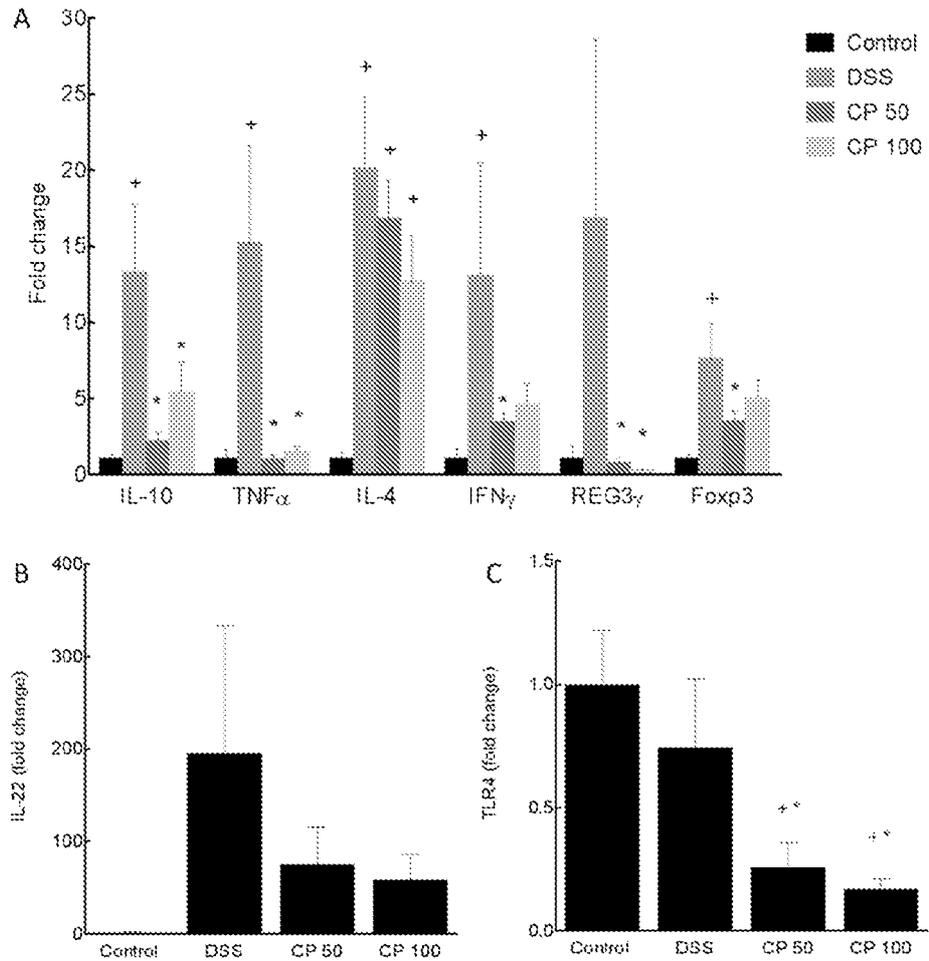


Fig. 5

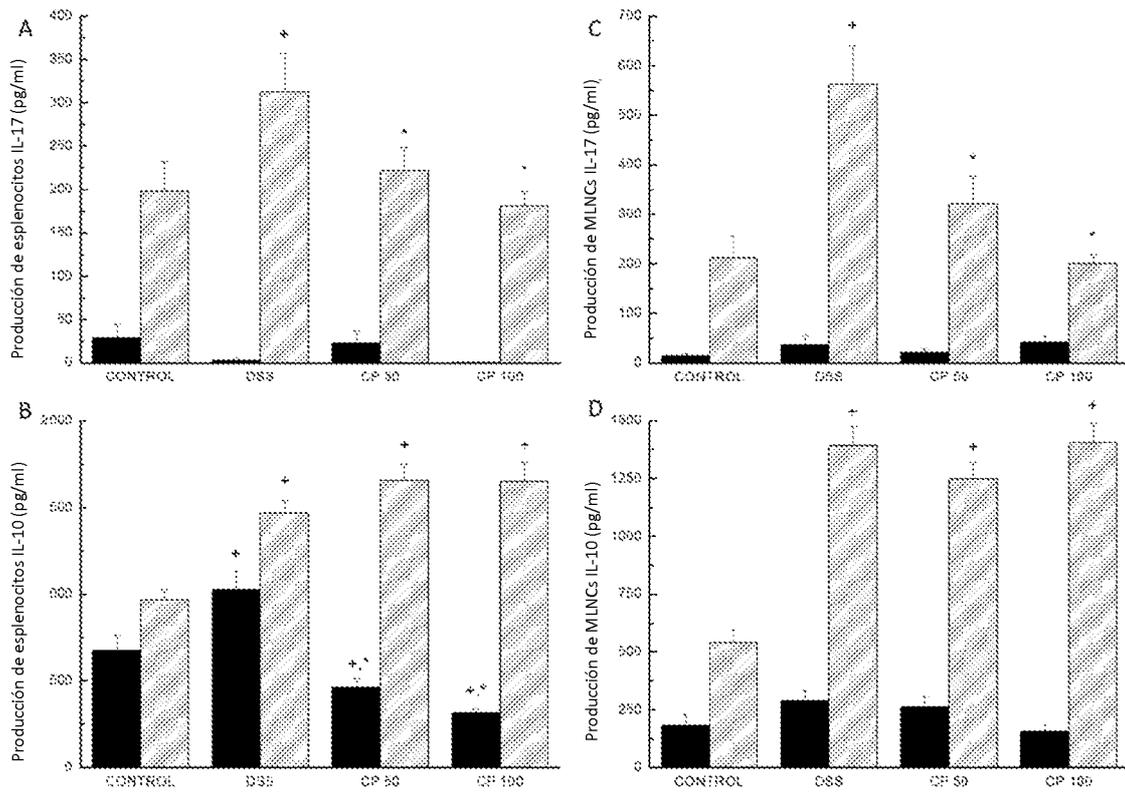


Fig. 6

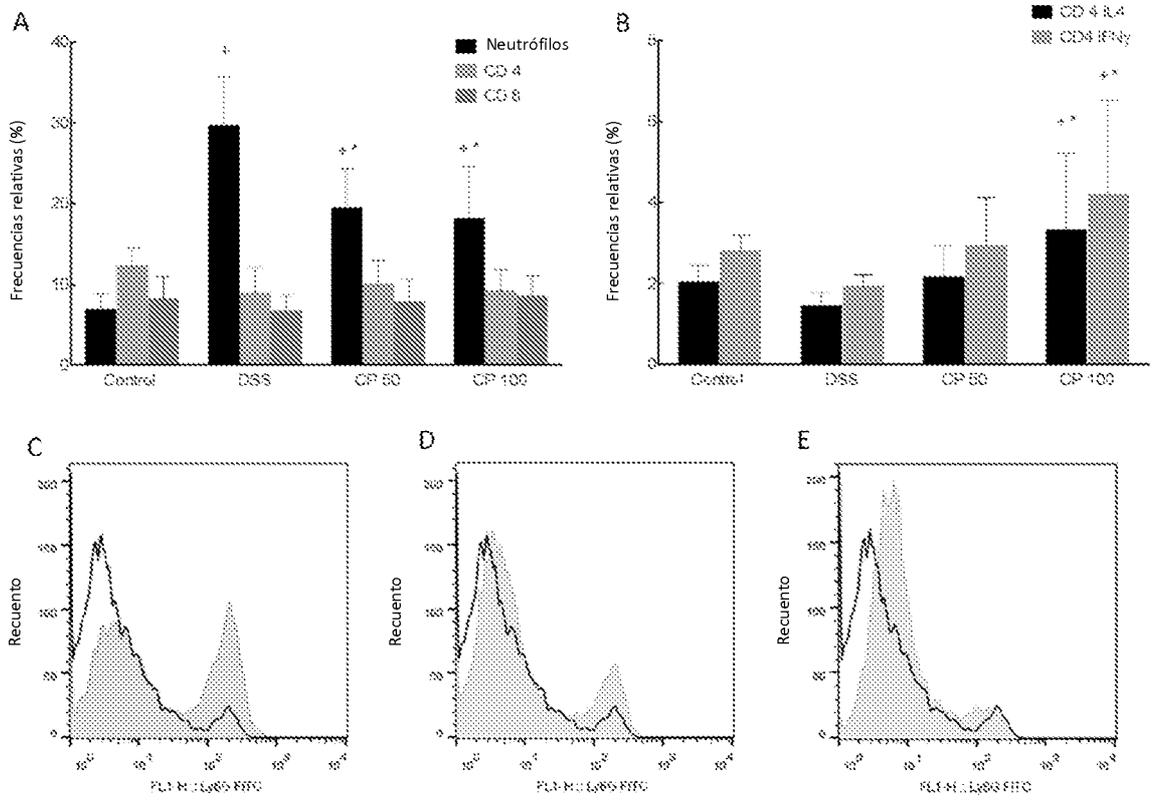


Fig. 7

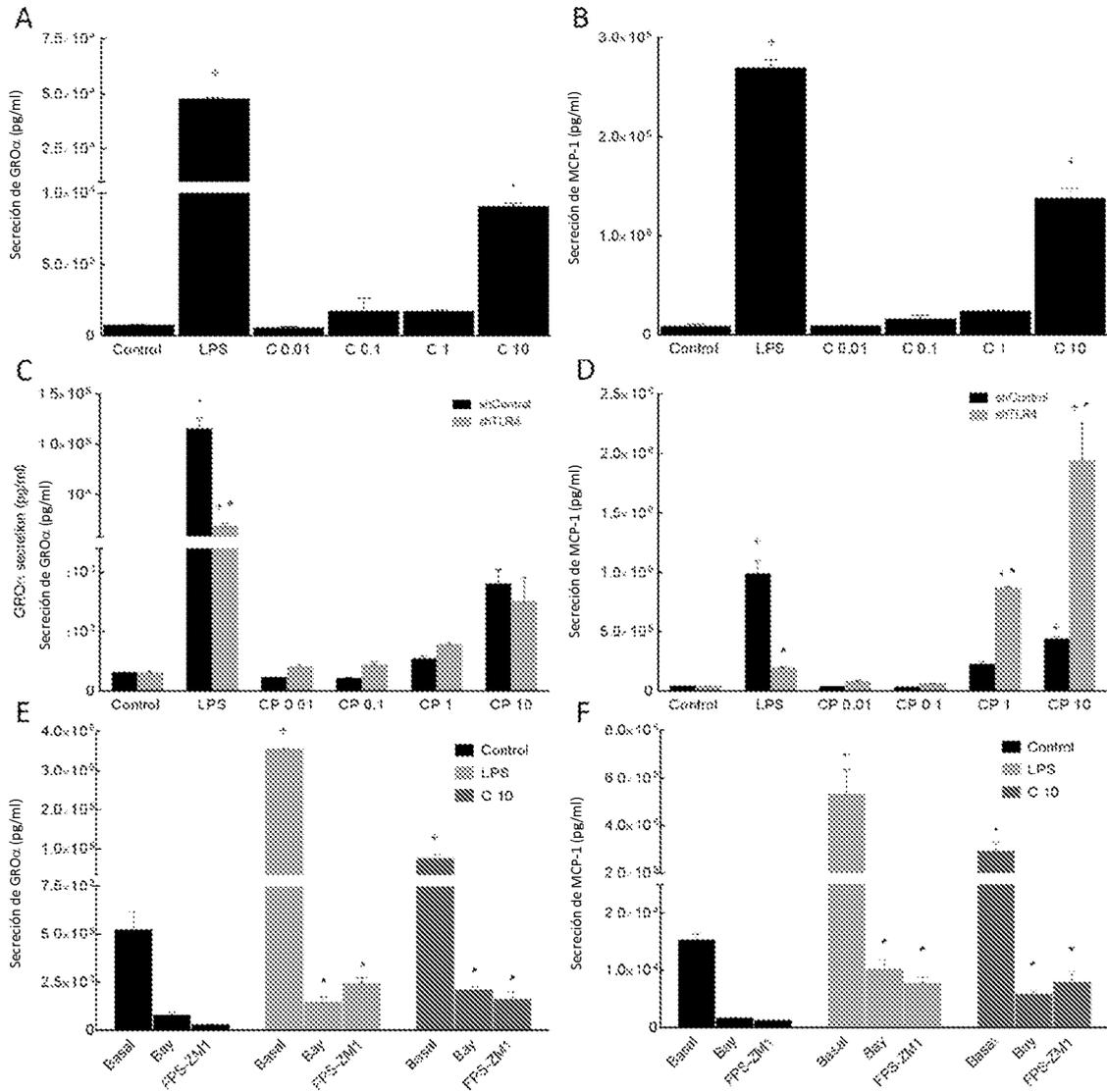


Fig. 8



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201630758

22 Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2016

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: **A61K38/17** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20070123455 A1 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA ) 31/08/2007 „ Resumen, párrafos 3, 8-10, 12, 38-39, 72-74,86, 87, 90 y reivindicación 7.	1, 4-7
A	US 20110201542 A1 (UNIVERSITY OF ILLINOIS ) 18/08/2011 „ Párrafos 4, 5, 6, 12, 14, 15, 17, 30, 43, 44,67, 82, 83, 86, 87, 89 y reivindicación 1.	1-7
A	LEHMANN, Frank S.; BURRI, Emanuel; BEGLINGER, Christoph. THE ROLE AND UTILITY OF FAECAL MARKERS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. Therapeutic advances in gastroenterology,2015, Vol. 8, Nº 1, Páginas 23-36. Todo el documento.	1-7
A	YUI, Satoru, et al. IMPLICATION OF EXTRACELLULAR ZINC EXCLUSION BY RECOMBINANT HUMAN CALPROTECTIN (MRP8 AND MRP14) FROM TARGET CELLS IN ITS APOPTOSIS-INDUCING ACTIVITY. Mediators of inflammation, 2002, Vol. 11, Nº 3, Páginas 165-172. Páginas 165, 166 y 171.	1-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
12.04.2018

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENTS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.04.2018

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2-3	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 4-7	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 2-3	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 4-7	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20070123455 A1 (UNIVERSITY OF CALIFORNIA )	31.08.2007
D02	US 20110201542 A1 (UNIVERSITY OF ILLINOIS )	18.08.2011
D03	LEHMANN, Frank S.; BURRI, Emanuel; BEGLINGER, Christoph. THE ROLE AND UTILITY OF FAECAL MARKERS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE.. Therapeutic advances in gastroenterology,, Vol. 8, Nº 1, Páginas 23-36	2015
D04	YUI, Satoru, et al. IMPLICATION OF EXTRACELLULAR ZINC EXCLUSION BY RECOMBINANT HUMAN CALPROTECTIN (MRP8 AND MRP14) FROM TARGET CELLS IN ITS APOPTOSIS-INDUCING ACTIVITY. . Mediators of inflammation, Vol. 11, Nº 3, Páginas 165-172	2002

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de invención consiste en una composición que comprende calprotectina, un dímero de la proteína S100A8 y la proteína S100A9 para su uso en el tratamiento de enfermedades afecciones inflamatorias intestinales (reivindicaciones 1-2 y 4-7). Dicha composición se administra por vía intrarrectal (reivindicación 3).

El documento D01 consiste en una composición para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

El documento D02 divulga una composición que comprende una proteína S100A8 y S100A9 o una proteína S100A8 y/o S100A9 mutante sustituida que contiene un residuo de serina en lugar de un residuo de cisteína en la posición 42 de S100A8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en una cantidad suficiente para reducir el efecto nocivo de la hipoxia tisular, un infarto, isquemia, aterosclerosis y/o estrés psicológico o físico en un paciente (ver párrafos 4, 5, 6, 12, 14, 15, 17, 30, 43, 44, 67, 82, 83, 86, 87, 89 y reivindicación 1).

El documento D03 divulga el uso de calprotectina como marcador en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias del intestino (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un estudio para dilucidar qué subunidad de la calprotectina es responsable de la actividad inductora de apoptosis mediante unión al zinc. Dicho documento divulga la posibilidad de que el suplemento de zinc pueda suprimir la destrucción tisular en sitios inflamatorios y sugiere mayor investigación sobre la actividad de la calprotectina in vivo (ver páginas 165, 166 y 171).

Los documentos D02 a D04 se consideran documentos que reflejan el estado de la técnica.

**1.- NOVEDAD (Art. 6.1 LP) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP).****1.1.- Reivindicaciones 1, 4-7**

El documento D01 se considera el más próximo al estado de la técnica y divulga una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de calprotectina,, un dímero de la proteína S100A8 o cualquier polipéptido cuya secuencia de ácidos nucleicos posee una identidad superior al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más con la secuencia de S100A8; y la proteína S100A9 o cualquier polipéptido cuya secuencia de ácidos nucleicos posee una identidad superior al 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más con la secuencia de S100A9 (ver resumen y párrafos 3, 8-10, 12, 38-39, 86, 87 y 90).

El documento D01 también divulga en su reivindicación 7 la administración de dicha composición en un sujeto que presenta uno o más síntomas de inflamación. La frase "síntomas de inflamación" es definida en los párrafos 72-74 de dicho documento D01 como síntomas de la enfermedad inflamatoria del intestino, como son dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal, pérdida de peso, fiebre, pérdida de apetito y otras complicaciones. Dicha frase es descrita con el mismo significado en la presente solicitud de invención.

Dado que la enfermedad inflamatoria intestinal comprende la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, se considera que las reivindicaciones 1, 4-7 no son nuevas y no implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 LP.

1.2.- Reivindicaciones 2 y 3.

El documento D01 divulga la administración del compuesto de forma sistémica, como por ejemplo la vía intraperitoneal de forma que la composición penetra con rapidez en la circulación en lugar de ejercer la acción de forma local sobre la mucosa inflamada, como reivindica la presente solicitud de invención alcanzando así un efecto técnico sorprendente.

Por tanto las reivindicaciones 2 y 3 se consideran nuevas e implican actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 LP.

2.- PATENTABILIDAD (Art. 4.1 LP)

Las reivindicaciones 1, 4-7 no cumplen los requisitos de patentabilidad en el sentido del artículo 4.1 LP.

Las reivindicaciones 2-3 cumplen los requisitos de patentabilidad en el sentido del artículo 4.1 LP.