

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 301**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2011 PCT/EP2011/055519**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO11124685**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2011 E 11718957 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2555789**

54 Título: **Péptidos inhibidores derivados del transcrito de tipo TREM-1 (TLT-1) y sus usos**

30 Prioridad:

**08.04.2010 EP 10305364**

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

**11.02.2021**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR y**

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIBOT, SÉBASTIEN y**

**DERIVE, MARC**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

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

ES 2 805 301 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

Péptidos inhibidores derivados del transcrito de tipo TREM-1 (TLT-1) y sus usos

## 5 Campo de la invención:

La presente invención se refiere a fragmentos de polipéptidos derivados de la proteína TLT-1 y sus usos para el tratamiento de afecciones inflamatorias y más particularmente para el tratamiento de la sepsis.

## 10 Antecedentes de la invención:

El shock séptico, un síndrome clínico complejo que resulta de una respuesta perjudicial y dañina a la infección en el hospedero, es la principal causa de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos. La sepsis se desarrolla cuando la respuesta inicial apropiada del hospedero a la infección sistémica se desregula y sobre amplifica con una estrecha interconexión entre la inflamación y la coagulación. Entre los candidatos que actúan como amplificadores de la respuesta inmune innata, algunos pertenecen a la familia de los receptores de activación expresados en células mieloides (TREM) [Bouchon, A., y otros, 2000; Bleharski, JR y otros, 2003; Haselmayer, P., y otros, 2007; Gibot, S. y otros, 2007]. El grupo de genes TREM de humanos se encuentra en el cromosoma 6p21.1 y codifica seis proteínas diferentes, TREM 1-5 y TLT-1 (transcrito tipo TREM-1). La TREM-1 de humanos (hTREM-1) consiste en una región extracelular de 194 residuos de aminoácidos (aa), una región de 29 aa que abarca la membrana y una cola citoplasmática corta de 5 aa. El dominio extracelular de tipo Ig contiene el motivo DxGxYxC que corresponde a un dominio Ig de tipo V. El dominio Ig está conectado a la región transmembranal por una porción de 60 aa que contiene tres sitios de N-glicosilación. La región que abarca la membrana contiene un residuo de Lys que forma un puente salino con un residuo de Asp del dominio transmembrana de una proteína DAP 12 que contiene ITAM, lo que permite la asociación entre TREM-1 y su proteína adaptadora [Bouchon, A., y otros, 2000; Kelker, MS y otros, 2004; Kelker, MS y otros, 2004]. El acoplamiento de TREMs desencadena una vía de señalización que involucra ZAP70 y SYK y el consiguiente reclutamiento y fosforilación en tirosinas de moléculas adaptadoras como GRB2, la activación de PI3K, PLC- $\gamma$ , ERK-1,2 y p38 MAPK [Haselmayer, P. y otros 2009; Gibot, S, 2005]. La activación de estas vías que finalmente conduce a la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B está regulada por CARD9-BCL10-MALT1 [Hara, H. y otros, 2007]. Es de destacar que, aunque los análisis cristalográficos pueden predecir el reconocimiento de TREM-1 mediante el uso de bucles de regiones determinantes complementarias (CDR) equivalentes a anticuerpos (como TCR, CD8 y CTLA-4), su ligando natural aún no se ha determinado.

Los experimentos de bloqueo usando una proteína de fusión TREM-1 o un péptido diseñado para CDR3 y la cadena "F" del dominio extracelular de TREM-1 mostraron una inflamación reducida que resulta en una mejor supervivencia en modelos murinos de endotoxemia y sepsis polimicrobiana [Bouchon, A., y otros, 2001; Gibot, S. y otros, 2006].

Los efectos protectores de modular la señalización de TREM-1 también son evidentes en otros modelos de inflamación aguda (isquemia-reperfusión, pancreatitis, shock hemorrágico) o inflamación crónica (enfermedades inflamatorias del intestino, artritis inflamatoria). Todos estos estudios sugieren un papel de TREM-1 en la amplificación de la inflamación infecciosa o estéril.

Además de TREM-1, el grupo de genes TREM incluye el Transcrito de tipo TREM-1 (TLT-1). TLT-1 es abundante, se expresa exclusivamente en plaquetas y megacariocitos, y está contenido en los gránulos de plaquetas  $\alpha$ . Después de la activación de plaquetas, TLT-1 se transloca a la superficie de las plaquetas [Washington, AV y otros, 2004]. TLT-1 contiene un dominio extracelular de tipo Ig de grupo v, una región transmembranal y una cola citoplasmática que comprende un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) y un dominio rico en poliprolina. A diferencia de otros miembros de la familia TREM, TLT-1 no se acopla a la cadena activadora DAP 12, mientras que se demostró que mejora la señalización de  $Ca^{++}$  en las células de leucemia basófila de rata (RBL), lo que sugiere que TLT-1 es un receptor coactivador [Barrow, AD. y otros, 2004].

La especificidad de la expresión de TLT-1 en las plaquetas sugirió que podría desempeñar un papel único en la hemostasia y/o trombosis. De hecho, se sugirió que la modulación de TLT-1 puede tener varias formas de modular la función plaquetaria, evitando de esta manera la hipercoagulación asociada a la inflamación (pero no directamente la inflamación) o el trastorno asociado a las plaquetas (por ejemplo, el trastorno de sangrado o coagulación) [Washington AV. y otros, 2009]. Esta modulación podría ser mediada de manera directa (al interferir con un ligando TLT-1) o indirecta (al modular la vía intracelular de TLT-1). Washington AV. y otros, 2009 sugiere además que TLT-1 puede minimizar el daño de los vasos y aumentar la agregación plaquetaria en el sitio de la lesión del vaso, evitando así la hemorragia. Washington AV. y otros, 2009 también demuestra que un péptido LR17 bloquea esta agregación mejorada por TLT-1.

Los inventores informan por primera vez en la presente descripción que los péptidos derivados de TLT-1 y TLT-1 exhiben propiedades antiinflamatorias al inhibir específicamente la actividad TREM-1. Dichos péptidos pueden amortiguar la señalización de TREM-1 y, por lo tanto, se comportan como inhibidores de TREM-1 de origen natural. Demuestran además que los mismos péptidos, como consecuencia de la inhibición de TREM-1 y su vía intracelular, también modulan in vivo la cascada proinflamatoria desencadenada por la infección, inhibiendo así la hiperreactividad asociada a TREM-1 y la consiguiente lesión de los órganos y la muerte durante la sepsis.

Resumen de la invención:

5 La invención se basa en el descubrimiento de que los péptidos derivados de TLT-1 y TLT-1 pueden inhibir específicamente TREM-1.

Los inventores demostraron primero que los péptidos derivados de TLT-1 humano (hTLT-1) y hTLT-1 pueden reconocer y unirse específicamente al ligando TREM-1 humano.

10 Los inventores también demostraron que, como resultado de la unión de péptidos derivados de hTLT-1 y hTLT-1 al ligando hTREM-1, los péptidos derivados de hTLT-1 y hTLT-1 pueden disminuir in vitro e in vivo la activación de células que expresan TREM-1 de humano inducida por hTREM-1, lo cual se caracteriza por una modulación de la señalización intracelular (vías de fosforilación), formación del complejo CARD9-MALT1-BCL10, activación de NF-KB (translocación nuclear), producción de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) y expresión de citocinas/quimiocinas (ARNm) y secreción (proteína).

15 Los inventores también demostraron que los péptidos derivados de TLT-1 pueden tratar trastornos asociados con TREM-1, es decir, enfermedades en las que la activación de TREM-1 desempeña un papel en el proceso fisiopatológico, como trastornos inflamatorios agudos (sepsis, sepsis grave o shock séptico), shock hemorrágico, isquemia-reperfusión, pancreatitis) o trastornos inflamatorios crónicos (enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades reumáticas, cáncer).

20 Por lo tanto, la invención se refiere a un polipéptido de 6 a 16 aminoácidos que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 4 para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la sec. con núm. de ident.: 8.

25 En una modalidad, el polipéptido para usar en la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la sec. con núm. de ident.: 9.

30 En una modalidad, el polipéptido para su uso en la presente invención consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la sec. con núm. de ident.: 9.

35 En una modalidad, el polipéptido para su uso en la presente invención consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la sec. con núm. de ident.: 8.

40 La presente invención se refiere además a un polipéptido de 6 a 16 aminoácidos que consiste de una secuencia de aminoácidos como se establece en sec. con núm. de ident.: 8 o que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 9.

45 En una modalidad, el polipéptido de la invención consiste de una secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 9.

En una modalidad, el polipéptido de la invención consiste de una secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 8.

La presente invención se refiere además a una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido como se describe anteriormente en la presente.

50 La presente invención se refiere además a un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico como se describe anteriormente en la presente.

55 La presente invención se refiere además a un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico como se describe anteriormente en la presente.

En una modalidad, la afección inflamatoria es sepsis, sepsis grave, shock séptico, shock hemorrágico, isquemia-reperfusión o pancreatitis.

60 En una modalidad, la afección inflamatoria es sepsis.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en donde dicha composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polipéptido como se describe anteriormente junto con al menos un excipiente aceptable farmacéuticamente.

65 La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende al menos un polipéptido como se describe anteriormente, o un ácido nucleico como se describe anteriormente, o un plásmido como se describe

anteriormente, o un vector de expresión como se describe anteriormente junto con al menos un excipiente aceptable farmacéuticamente.

5 La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de una afección inflamatoria, en la que dicha composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un polipéptido de 6 a 16 aminoácidos que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 4, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la sec. con núm. de ident.: 8, junto con al menos un excipiente aceptable farmacéuticamente.

10 Descripción detallada de la invención:

*Definiciones:*

15 A lo largo de la especificación, se emplean varios términos y se definen en los siguientes párrafos.

Como se usa en la presente descripción, el término "TREM-1" para "Receptor activador expresado en células mieloides 1" denota una molécula de la superficie celular identificada tanto en neutrófilos polimorfonucleares humanos como murinos y monocitos maduros. Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y activa las vías de señalización aguas abajo con la ayuda de una proteína adaptadora denominada DAP 12. La expresión de TREM-1 se regula en gran medida por neutrófilos y monocitos en presencia de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, tanto en cultivo celular como en muestras de tejido de pacientes con infección. En contraste interesantemente, TREM-1 no es regulado en muestras de pacientes con enfermedades inflamatorias no infecciosas como psoriasis, colitis ulcerosa o vasculitis causadas por complejos inmunes. Además, cuando TREM-1 se une a su ligando, se observa un efecto sinérgico de LPS y una síntesis amplificada de las citocinas proinflamatorias como TNF-[alfa] junto con una inhibición de la producción de IL-10.

Como se usa en la presente descripción, el término "TLT-1" para "transcrito de tipo TREM-1" denota un miembro de la familia TREM. El trabajo inicial del grupo Mc Vicar [Washington AV y otros, 2004] demostró que TLT-1 es abundante, específico para el linaje de plaquetas y megacariocitos, y está contenido en los gránulos de plaquetas  $\alpha$ . Después de la activación de plaquetas con trombina o LPS, TLT-1 se transloca a la superficie de las plaquetas. TLT-1 contiene un dominio extracelular de tipo Ig de grupo v, una región transmembranal y una cola citoplasmática que comprende un motivo inhibidor inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) y un dominio rico en poliprolina. A diferencia de otros miembros de la familia TREM, TLT-1 no se acopla a la cadena activadora de DAP 12, mientras que se demostró que mejora la señalización de Ca<sup>++</sup> en las células de leucemia basófila de rata (RBL), lo que sugiere que TLT-1 es un receptor coactivador. La secuencia de aminoácidos de TLT-1 se describe como la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident. 1.

Los polipéptidos derivados de TLT-1 se describen en la tabla 1 más abajo.

Tabla 1: polipéptidos derivados de TLT-1

Nombre del polipéptido	Secuencia	identidad de secuencia
TLT-1-CDR2	SAVDRRAPAGRR	Sec. con núm. de ident. 2
TLT-1-CDR3	CMVDGARGPQILHR	Sec. con núm. de ident. 3
LR17	LQEEDAGEYGCMVDGAR	Sec. con núm. de ident. 4
TLT-1-LRI 7 aleatorio	GAEREVCMDEYGALQDG	sec. con núm. de ident. 5
LR6-1	LQEEDA	sec. con núm. de ident. 6
LR6-2	EDAGEY	sec. con núm. de ident. 7
LR6-3	GEYGCM	sec. con núm. de ident. 8
LR12	LQEEDAGEYGCM	sec. con núm. de ident. 9

Como se usa en la presente descripción, el término "variantes conservadoras de la función" denota péptidos derivados de un polipéptido de la invención en donde un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima se cambió sin alterar la conformación y función general del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, el reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de modo que el porcentaje de similitud de secuencia de proteínas o aminoácidos entre dos proteínas cualquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % según lo determinado de acuerdo con un método de alineamiento tal como el Método de Cluster, en donde la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de la función" también incluye un polipéptido que tiene al menos 20 % de identidad de aminoácidos según lo determinado por los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente 40 % con mayor preferencia 60 %, preferentemente al menos 75 %, con la máxima preferencia al menos 85 %, y aún con mayor preferencia al menos 90 %,

y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína nativa o original con la que se compara.

5 Como se usa en la presente descripción, el término "derivado" se refiere a una variación de un polipéptido de la invención o de una variante conservadora de la función del mismo que se modifica de cualquier otra manera, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido, mediante la adición de un compuesto químico en cualquiera de los aminoácidos de la secuencia, para modificar *in vitro* o *in vivo* la conformación, actividad, especificidad, eficacia o estabilidad del polipéptido.

10 Como se usa en la presente descripción, los términos "tratar" o "tratamiento" denotan revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

15 De acuerdo con la invención el término "farmacéuticamente" o "aceptable farmacéuticamente" se refiere a composiciones y entidades moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administran a un mamífero, especialmente un humano, de manera adecuada. Un portador o excipiente aceptable farmacéuticamente se refiere a una carga líquida, semisólida o sólida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

20 De acuerdo con la invención, el término "paciente" o "individuo" a tratar se refiere a un mamífero humano o no humano (como un roedor (ratón, rata), un felino, un canino o un primate) afectado o que es probable se afectado por trastornos inflamatorios. Preferentemente, el sujeto es un humano.

*Polipéptidos y usos de los mismos:*

25 Un primer aspecto de la presente descripción se refiere a un polipéptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident. 4 y una variante conservadora de la función.

30 En una modalidad preferida, el polipéptido de acuerdo con la descripción tiene una longitud de 6 a 20 aminoácidos, o de 10 a 20 aminoácidos, o de 12 a 18 aminoácidos o de 14 a 16 aminoácidos.

En otra modalidad, el polipéptido de acuerdo con la descripción comprende una secuencia de aminoácidos 6 consecutiva del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.: 6, la sec. con núm. de ident.: 7 o la sec. con núm. de ident.: 8.

35 En otra modalidad preferida, el polipéptido de acuerdo con la descripción comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en sec. con núm. de ident.: 9.

En otra modalidad preferida, el polipéptido de acuerdo con la descripción comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en sec. con núm. de ident.: 4.

40 En otra modalidad, el polipéptido de acuerdo con la descripción puede tener configuración D o L.

45 En otra modalidad, el aminoácido del extremo amino del polipéptido de acuerdo con la descripción tiene un grupo amino terminal acetilado, y el aminoácido del extremo carboxilo tiene un grupo carboxilo terminal amidado. Por lo tanto, la descripción también incluye derivados del péptido de la invención en donde el extremo amino terminal está acetilado o en donde el extremo carboxilo terminal está amidado.

50 Además, los polipéptidos de acuerdo con la descripción pueden sufrir modificaciones químicas reversibles para aumentar su biodisponibilidad (incluyendo la estabilidad y la solubilidad en grasas) y su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y el tejido epitelial. Los ejemplos de tales modificaciones químicas reversibles incluyen la esterificación de los grupos carboxilo de los aminoácidos glutámico y aspártico con un alcohol, eliminando de esta manera la carga negativa del aminoácido y aumentando su hidrofobicidad. Esta esterificación es reversible, ya que el enlace éster formado es reconocido por las esterasas intracelulares que lo hidrolizan, restaurando la carga de los residuos aspártico y glutámico. El efecto neto es una acumulación de polipéptido intracelular, ya que el polipéptido desesterificado internalizado no puede atravesar la membrana celular.

55 Otro ejemplo de tales modificaciones químicas reversibles incluye la adición de una secuencia peptídica adicional, que permite el aumento de la permeabilidad a la membrana, como un péptido TAT o un péptido de penetración (ver - Charge-Dependent Translocation of the Trojan. A Molecular View on the Interaction of the Trojan Peptide Penetratin with the Polar Interface of Lipid Bilayers. Biophysical Journal, Volumen 87, Número 1, 1 de julio de 2004, páginas 332-343).

60 Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden obtenerse a través de métodos convencionales de síntesis química de polipéptidos en fase sólida, siguiendo una metodología basada en Fmoc y/o Boc (véase Pennington, MW y Dunn, BN (1994). Peptide synthesis protocols. Humana Press, Totowa.).

65 Alternativamente, el polipéptido de acuerdo con la invención puede obtenerse mediante métodos convencionales basados en tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, mediante un método que, en resumen, incluye insertar la secuencia de

ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención en un plásmido o vector apropiado, transformar células competentes para dicho plásmido o vector, y hacer crecer dichas células en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de la invención y, si se desea, aislar y (opcionalmente) purificar el polipéptido de la invención a través de medios convencionales conocidos por expertos en estos asuntos. La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención puede deducirse fácilmente de la correspondencia que existe entre los aminoácidos y los codones de nucleótidos que codifican dichos aminoácidos.

En este caso, un objeto adicional de la invención es una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido de la invención. En una modalidad particular, dicho ácido nucleico se selecciona de ADN monocatenario, ADN bicatenario y ARN. Objetos adicionales de esta invención son plásmidos y vectores de expresión que contienen dicha secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención. Objetos adicionales de esta descripción son células procariontas o eucariotas que expresan el polipéptido de la invención. Puede encontrarse una revisión de los principios de la tecnología del ADN recombinante, por ejemplo, en el libro de texto titulado "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering, "RW Old & SB Primrose, publicado por Blackwell Scientific Publications, cuarta edición (1989).

Como se describió, la presente descripción también describe polipéptidos que son funcionalmente equivalentes a los polipéptidos de la invención o "variante conservadora de la función". En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que el péptido en cuestión tiene al menos una de las actividades biológicas del péptido de la invención, como, por ejemplo, la capacidad de disminuir la inflamación.

La capacidad de disminuir la inflamación de los polipéptidos de la invención se hará evidente para la persona experta implementando una prueba simple para evaluar la disminución de la inflamación debida a los polipéptidos. Por ejemplo,  $5 \times 10^5$  neutrófilos humanos aislados se incuban en presencia de 100 ng/ml de LPS y 10 µg/ml de mAb anti-TREM-1 con o sin 20 µg/ml de polipéptido durante 24 horas a 37 °C/ 5 % CO<sub>2</sub>. Luego se colecta el sobrenadante y se miden las concentraciones de TNF-α e IL-6 por ELISA. Si el péptido estudiado inhibe TREM-1, las concentraciones de citocinas deben disminuir hasta en un 30 % o más en comparación con el LPS + mAb sin péptido.

*Ácidos nucleicos, vectores y células hospedero recombinantes:*

Otro aspecto adicional de la invención se relaciona con una molécula de ácido nucleico que codifica polipéptidos de acuerdo con la invención.

En una modalidad preferida de la descripción, la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 3, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de ident. 7, sec. con núm. de ident. 8 o sec. con núm. de ident. 9.

Una "secuencia codificante" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificante para una proteína puede incluir un codón de inicio (generalmente ATG) y un codón de parada.

Estas moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica, en particular por mutagénesis dirigida al sitio del gen que codifica la proteína nativa. Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en un vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o vector viral.

Por lo tanto, un objeto adicional de la presente descripción se refiere a un vector y un casete de expresión en donde una molécula de ácido nucleico de la invención está asociada con elementos adecuados para controlar la transcripción (en particular, promotor, potenciador y, opcionalmente, terminador) y, opcionalmente, traducción, y también los vectores recombinantes en los que se inserta una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Estos vectores recombinantes pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación o vectores de expresión.

Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo por el cual puede introducirse una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) en una célula hospedero, para transformar el hospedero y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifique un polipéptido o derivado quimérico de la invención. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1 beta d2-4 y similares.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares.

Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores adenovirales, retrovirales, virus del herpes y AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células

empaquetadoras o mediante transfección transitoria con plásmidos o virus auxiliares. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etcétera. Los protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 y WO 94/19478.

Los ejemplos de promotores y potenciadores utilizados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y potenciador de SV40 (Mizukami T. y otros 1987), el promotor LTR y el potenciador del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana Y y otros 1987), promotor (Mason JO y otros 1985) y potenciador (Gillies SD y otros 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

La presente descripción también incluye sistemas de suministro de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención, que puede usarse en terapia génica *in vivo* o *ex vivo*. Esto incluye, por ejemplo, vectores de transferencia viral tales como los derivados de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, que se usan convencionalmente en terapia génica. Esto también incluye sistemas de suministro de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención y un vehículo de administración de genes no virales. Los ejemplos de vehículos no virales de administración de genes incluyen liposomas y polímeros tales como polietiliminas, ciclodextrinas, polímeros de histidina/lisina (HK), etcétera.

Otro objeto de la presente descripción es también una célula hospedero procarionta o eucariota transformada genéticamente con al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

El término "transformación" significa la introducción de un gen "extraño" (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN en una célula hospedero, de modo que la célula hospedero expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. Una célula hospedero que recibe y expresa el ADN o ARN introducido ha sido "transformada".

Preferentemente, para expresar y producir los polipéptidos, y en particular el polipéptido de acuerdo con la invención, se elegirán células eucariotas, en particular células de mamífero, y más particularmente células humanas.

Típicamente, podrían usarse líneas celulares tales como CHO, BHK-21, COS-7, C127, PER.C6 o HEK293, por su capacidad para procesar las modificaciones postraduccionales correctas de los derivados.

La construcción de vectores de expresión de acuerdo con la invención, la transformación de las células hospedero puede llevarse a cabo utilizando técnicas convencionales de biología molecular. Los derivados de la subunidad c de la V-ATPasa de la divulgación pueden obtenerse, por ejemplo, cultivando células genéticamente transformadas de acuerdo con la divulgación y recuperando el derivado expresado por dicha célula del cultivo. Después, si es necesario, pueden purificarse mediante procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etcétera.

En particular, los métodos convencionales para preparar y purificar proteínas recombinantes pueden usarse para producir las proteínas de acuerdo con la invención

#### *Métodos terapéuticos, usos y composiciones Farmacéuticas:*

Otro objeto de la presente invención se refiere a un polipéptido de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria.

Las afecciones inflamatorias de acuerdo con la invención incluyen, entre otras, alergias, asma, miopatías, cáncer, artritis inflamatoria, enfermedades inflamatorias intestinales, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), gripe aviar, viruela y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), grave. síndrome respiratorio agudo (SRAS), isquemia y síndromes de reperfusión, shock hemorrágico.

Las afecciones inflamatorias de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, sepsis, sepsis grave, shock séptico, shock hemorrágico, isquemia-reperfusión o pancreatitis.

En una modalidad preferida, la afección inflamatoria es sepsis.

El polipéptido de acuerdo con la invención puede tratar afecciones inflamatorias a través de sus propiedades de receptor señuelo.

Por "receptor señuelo" se entiende que los polipéptidos de acuerdo con la invención atrapan el ligando TREM-1 y evitan sus efectos fisiológicos sobre TREM-1.

Por lo tanto, los polipéptidos de acuerdo con la invención podrían formar parte de una terapia combinada (dirigida a varios objetivos terapéuticos) con el objetivo de detener más eficazmente la sepsis.

- 5 Un objeto adicional de esta invención es una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polipéptido de acuerdo con la invención, junto con al menos un excipiente aceptable farmacéuticamente. En una modalidad particular, dicha composición farmacéutica también contiene uno o más péptidos (COOH). Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención puede contener una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector que contiene al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención, junto con al menos un adyuvante y/o un excipiente aceptable farmacéuticamente. Dicho vector puede usarse en terapia génica.
- 10 Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad suficiente del derivado químico de la invención para tratar afecciones inflamatorias con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.
- 15 Se debe entender que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención serán decididos por el médico que lo atiende dentro del alcance del criterio médico. El nivel de dosis específica terapéuticamente efectiva para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidencia con el polipéptido específico empleado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es correcto para los expertos en la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores que aquellos requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Un medicamento típicamente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferentemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad efectiva de un fármaco se administra comúnmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.
- 20 Los productos activos de la invención (polipéptidos o vectores) pueden administrarse para el tratamiento de afecciones inflamatorias, manifestadas, por ejemplo, por enrojecimiento, aumento de calor, hinchazón, dolor y pérdida de función.
- 25 La cantidad terapéuticamente efectiva del producto activo de la invención [péptidos o vectores (construcciones)] que debe administrarse, así como la dosis para el tratamiento de una afección patológica con los péptidos y/o composiciones farmacéuticas de la invención, dependerán en numerosos factores, que incluyen la edad y el estado del paciente, la gravedad del trastorno o trastorno, el método y la frecuencia de administración y el péptido particular que se utilizará.
- 30 La presentación de las composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos o vectores (construcciones) de la invención puede ser de cualquier forma que sea adecuada para la administración, por ejemplo, sólida, líquida o semisólida, como cremas, pomadas, geles o soluciones, y estas composiciones pueden administrarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía oral, parenteral, inhalación o tópica, por lo que incluirán los excipientes aceptable farmacéuticamente necesarios para formar la forma de administración deseada. Puede encontrar una revisión de las diferentes formas farmacéuticas para administrar medicamentos y de los excipientes necesarios para obtenerlos, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica" (Tratado de Farmacia Galénica), C. Faul i Trillo, 1993, Luz n 5, S.A. Ediciones, Madrid.
- 35 En las composiciones farmacéuticas para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local, pulmonar o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, para animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de la vía oral tales como tabletas, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, formas de administración en aerosoles, implantes, subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.
- 40 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contiene vehículos que son aceptable farmacéuticamente para una formulación que se puede inyectar. Estos pueden estar en soluciones salinas estériles, isotónicas particulares (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de estas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas las que después de la adición, en dependencia del caso, de agua o solución salina fisiológica esterilizada, permite la constitución de soluciones inyectables.
- 45 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de la contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- 50
- 55
- 60
- 65

5 Las soluciones que comprenden los compuestos de la invención como una base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclándose adecuadamente con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse además en glicerina, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

10 Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales aceptables farmacéuticamente incluyen las sales ácidas de adición (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico oxálico, mandélico, y similares. Las sales con los grupos carboxilo libres pueden derivarse, además, de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

15 El portador puede ser además un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, con el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y con el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse por el uso de agentes de absorción retardada en las composiciones, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, y después esterilizar por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución de este, anteriormente esterilizada por filtración.

35 Después de la formulación, las soluciones serán administradas de forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse las cápsulas de liberación del fármaco y similares.

40 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, si es necesario la solución deberá regularse adecuadamente con tampón y primero, el diluyente líquido se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, a la luz de la presente descripción los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o se inyecta en el sitio propuesto de infusión. Algunas variaciones en la dosificación ocurrirán necesariamente en dependencia de las afecciones del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará en cualquier caso la dosis adecuada para el sujeto individual.

50 El polipéptido de la invención puede formularse como una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. Además, pueden administrarse múltiples dosis.

55 Además de los compuestos de la invención formulados para la administración parenteral, tal como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas aceptable farmacéuticamente incluyen, por ejemplo, tabletas u otros sólidos para la administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma usada actualmente.

60 Como se mencionó anteriormente, los péptidos de acuerdo con la invención podrían formar parte de una terapia combinada con el fin de detener más eficazmente la inflamación. En este caso, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que incluye al menos un péptido de la invención; junto con otro u otros compuesto(s) inhibidores de la inflamación, por ejemplo, compuestos antiinflamatorios no esteroideos.

65 Un objeto adicional de esta descripción se refiere a los polipéptidos de la invención o de vectores que contienen al menos una secuencia que codifica un polipéptido de la invención para el tratamiento de afecciones inflamatorias que incluyen, pero no se limitan a, alergias, asma, miopatías, cáncer, agudo síndrome de dificultad respiratoria (SDRA), sepsis, influenza aviar, viruela y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), síndrome respiratorio agudo severo (SARS).

Además, la presente descripción proporciona un método para el tratamiento de afecciones inflamatorias en mamíferos el cual consiste en administrar a dicho mamífero que padece dicha enfermedad patológica una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polipéptido de la invención, o de un vector que contiene al menos una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la invención, preferentemente en forma de una composición farmacéutica que lo contiene. En una modalidad particular, dicha composición farmacéutica contiene, además del péptido o péptidos de la invención, uno o más péptidos (COOH).

*Métodos de detección:*

Otro objeto de la presente descripción se refiere a un método para seleccionar un compuesto que invalida la proteína TREM-1.

En particular, la presente descripción proporciona un método para seleccionar un inhibidor de la proteína TREM-1 para el tratamiento de una afección inflamatoria.

Por ejemplo, el método de detección puede medir la unión de un compuesto candidato a la proteína TREM-1, o a las células o membranas que presentan la proteína TREM-1 o una proteína de fusión de la misma mediante un marcador asociado directa o indirectamente con el compuesto candidato. Alternativamente, un método de detección puede implicar medir o, cualitativa o cuantitativamente, detectar la competencia de unión de un compuesto candidato al receptor con un competidor marcado (por ejemplo, antagonista).

En una modalidad particular, el método de detección comprende los pasos las etapas que consisten de:

- a) proporcionar una pluralidad de células que expresan la proteína ligando TREM-1 y células que expresan la proteína TREM-1;
- b) incubar dichas células con un compuesto candidato;
- c) determinar si dicho compuesto candidato se une a la proteína ligando TREM-1;
- y
- d) seleccionar el compuesto candidato que inhibe la interacción TREM-1/ligando de TREM-1.

Los neutrófilos producen especies reactivas de oxígeno en presencia de LPS, mAb anti-TREM-1 o plaquetas (que expresan constitutivamente el ligando TREM-1) con un efecto sinérgico de estos diferentes inductores mediado por TREM-1 unido a la membrana de neutrófilos. Esperamos una reducción de la producción de ROS cuando los neutrófilos se incuban en presencia de algunos péptidos que inhiben la interacción TREM-1/ligando de TREM-1.

La producción de ROS puede cuantificarse fácilmente mediante el uso de un sustrato fluorogénico (DCFDA: 5-(y-6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato(carboxi-H2DCFDA) \*isómeros mixtos\*). Por ejemplo,  $2,5 \times 10^5$  neutrófilos humanos aislados se incuban 2 horas a 37 °C 5 % CO<sub>2</sub> con 5 μM de DCFDA, en presencia de 20 μg/ml de mAb anti-TREM-1 con o sin LPS de 100 ng/ml. La producción de ROS por activación de TREM-1 y sus modulaciones por polipéptidos se cuantifica por citometría de flujo: si el péptido estudiado inhibe TREM-1, la intensidad de fluorescencia media (MFI) debe disminuir en comparación con las condiciones sin mAb TREM-1.

Este ensayo rápido nos permitirá determinar los mejores péptidos inhibidores de TREM-1 para estudiarlos en otros experimentos como la activación de NF-κB, la producción de citocinas, la fosforilación de proteínas.

En general, dichos métodos de detección implican proporcionar células apropiadas que expresan en su superficie a la proteína TREM-1, sus ortólogos y derivados de la misma. En particular, un ácido nucleico que codifica la proteína TREM-1 puede emplearse para transfectar células para expresar de ese modo la proteína TREM-1. Dicha transfección puede lograrse por métodos bien conocidos en la técnica.

En una modalidad particular, las células se seleccionan del grupo que consiste en células inmunes implicadas en la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios que incluyen, pero no se limitan a, monocitos/macrófagos y neutrófilos.

El método de detección de la descripción puede emplearse para determinar un inhibidor poniendo en contacto tales células con compuestos a detectar y determinando si dicho compuesto invalida o no a la proteína TREM-1.

De acuerdo con una modalidad, el compuesto candidato puede seleccionarse de una biblioteca de compuestos previamente sintetizados, o una biblioteca de compuestos para los que se determina la estructura en una base de datos, o de una biblioteca de compuestos que se sintetizaron de nova o compuestos naturales.

El compuesto candidato puede seleccionarse del grupo de (a) proteínas o péptidos, (b) ácidos nucleicos y (c) compuestos orgánicos o químicos (naturales o no). Ilustrativamente, pueden obtenerse bibliotecas de ácidos nucleicos candidatos preseleccionados realizando el método SELEX como se describe en los documentos US 5,475,096 y US 5,270,163. Más ilustrativamente, el compuesto candidato puede seleccionarse del grupo de anticuerpos dirigidos contra el complejo PP1/GADD34.

La invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras:

Figura 1: LR17 se une específicamente al ligando TREM-1.

5

Para estos experimentos, usamos LR17-aleatorio como péptido control de secuencia aleatoria.

Inmunotransferencia de rhTLT-1, rhTREM-1, LR17 y LR17-aleatorio revelado por mAb anti-TREM-1 de ratón (agonista de TREM-1).

10

El análisis de citometría de flujo de la unión de LR17 marcado con FITC (1 o 5 µg/ml) al ligando TREM-1 expresado en plaquetas humanas en reposo o activadas con trombina (5 U/ml) se revierte mediante la incubación conjunta con LR17 no marcado, sTLT-1 o LP17, un péptido derivado de TREM-1.

15

(C-D) Ensayos de resonancia de plasmón superficial de sobrenadantes de neutrófilos estimulados con LPS a un sensor recubierto con rTREM-1 en ausencia (C) o presencia (D) de LR17.

Figura 2: LR17 inhibe específicamente la activación de TREM-1 atrapando su ligando, actuando como un receptor señuelo.

20

Para estos experimentos, se estimularon neutrófilos humanos aislados con agonista de TREM-1 (aTREM-1, 5 µg/ml) con o sin LR17 (30 µg/ml) o péptido LR17-aleatorio de control (30 µg/ml) en los tiempos indicados. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes. Los resultados son la media ± DE. Los valores de p son \*\*\*p<0.001 \*\*p<0.01 \*p<0.05 [aTREM-1 + LR17] con respecto a [aTREM-1].

25

(A) Activación de la vía de fosforilación de TREM-1: Western Blot de lisados de neutrófilos estimulados durante 1, 3, 10, 30 y 60 minutos, analizados con anticuerpos contra fosfo (p)-p38 y (p)-ERK1/2.

(B) Formación del complejo CARD9-MALT1-BCL10: Inmunotransferencia de MALT-1 después de la inmunoprecipitación con mAb anti-BCL 10 de lisados de neutrófilos estimulados durante 20 minutos.

(C) Translocación nuclear de NF-KB: ELISA de subunidades nucleares p50 y p65 de NF-kB a partir de neutrófilos tratados durante 2 horas.

30

(D) Producción de ROS: Cuantificación por citometría de flujo (reducción de DCFDA) de la producción de ROS a partir de neutrófilos después de 2 horas de estimulación.

Expresión de citocinas: Niveles de ARNm de TNF-α en neutrófilos estimulados durante 6 horas

(F) Producción de citocinas: ELISA de TNF-α en neutrófilos tratados durante 2, 6 y 24 horas.

35

Figura 3: LR17 exhibe propiedades antiinflamatorias al disminuir la activación celular inducida por LPS- o LPS y aTREM-1.

40

Para estos experimentos, se estimularon neutrófilos o monocitos humanos aislados con LPS (0,1 µg/ml) y agonista de TREM-1 (aTREM-1, 5 µg/ml) con o sin LR17 (30 µg/ml) o péptido LR17-aleatorio de control (30 µg/ml), en los tiempos indicados. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes. Los resultados son la media ± DE. Los valores de p son \*\*\*p<0.001 \*\*p<0.01 \*p<0.05 [LPS/LR17] con respecto a [LPS] o [LPS + aTREM-1/LR17] con respecto a [LPS + aTREM-1].

45

(A) Western Blot de lisados de neutrófilos estimulados durante 1, 3, 10, 30 y 60 minutos, analizados con anticuerpos contra el fósforo (p)-p38 y (p)-ERK1/2.

(B) Formación del complejo CARD9-MALT1-BCL10: La inmunotransferencia de MALT-1 después de la inmunoprecipitación con anti-BCL 10 puede ser a partir de lisados de neutrófilos estimulados durante 20 minutos.

(C) Translocación nuclear de NF-KB: ELISA de subunidades nucleares p50 y p65 de NF-kB a partir de neutrófilos tratados durante 2 horas.

50

(D) Producción de ROS: Cuantificación por citometría de flujo (reducción de DCFDA) de la producción de ROS a partir de neutrófilos después de 2 horas de estimulación.

(E) La determinación cuantitativa de la fagocitosis de neutrófilos y el estallido oxidativo inducido por E. Coli se realizó por citometría de flujo. sTLT-1/LR17 no mostró acción sobre el estallido oxidativo inducido por PMA o fMLP (no mostrado). Los datos (media ± DE) son representativos de 6 experimentos diferentes.

55

(F) Expresión de citocinas: Niveles de ARNm de TNF-α en neutrófilos estimulados durante horas.

(G-H) Producción de citocinas: ELISA de TNF-α en neutrófilos tratados durante 2, 6 y 24 horas.

(I) ELISA de TNF-α producido por monocitos humanos nativos o silenciados en Trem-1.

60

Figura 4: La modulación de TREM-1 asociada a LR17 protege a los ratones endotoxémicos de la muerte y la respuesta sistémica.

65

Se agruparon al azar ratones Balb/c machos (20-23 g) (15 ratones por grupo) y se trataron con un LD50 de LPS. LR17 (100 µg o 250 µg en 0,2 ml de NaCl 0,9 %), LR17-aleatorio (1.100 µg en 0,2 ml de NaCl 0,9 %), o 0,2 ml de NaCl 0,9 % se administró 60 minutos antes o 60 minutos después de LPS. Se sacrificaron 4-6 animales por grupo tras una sobredosis de pentotal a las 2 y 4 horas después de la inyección de LPS y se tomaron muestras de sangre mediante punción cardíaca.

Los resultados son la media  $\pm$  DE. Los valores de p son \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 en comparación con los animales de control.

5 (A) El tratamiento con LR17 confiere una ventaja de supervivencia como lo muestra la curva de supervivencia (prueba Log Rank, p=0,0032) sin diferencias entre las dosis o los tiempos de inyección del LR17. (B-E) ELISA a partir de plasma TNF-a, IL-6, IL-10 y sTREM-1.

Figura 5: La modulación de TREM-1 asociada a LR17 protege a los ratones contra la sepsis polimicrobiana.

10 Se sometieron ratones Balb/c machos adultos (20-23 g) a ligadura cecal y punción bajo anestesia con isoflurano y se agruparon aleatoriamente (n=5-10 por grupo) para recibir un único LR17 (100  $\mu$ g en 0,2 mL de NaCl 0,9 %), LR17-aleatorio (100  $\mu$ g en 0,2 ml de NaCl 0,9 %), o 0,2 ml de inyección i.p. de NaCl 0,9 %. Después de 24 horas, los animales fueron sacrificados bajo anestesia. Los resultados son la media  $\pm$  DE. Los valores de p son \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 en comparación con los animales de control.

15 (A) ELISA a partir de TNF-a, IL-6, una IL-10 en el plasma, los líquidos de lavado peritoneal y broncoalveolar.  
 (B) cuantificación de ARNm por q-PCR de IL-6 y TNF-a en pulmón e hígado.  
 (C) ELISA a partir de líquidos de lavado de plasma y broncoalveolar TATc.  
 (D) Recuento de plaquetas en sangre completa.  
 20 (E) Recuentos celulares en los líquidos de lavado peritoneal y broncoalveolar.  
 (F) Examen histopatológico de los pulmones 24 horas después de la CLP. La hemorragia intraalveolar, la precipitación de proteínas y la infiltración de leucocitos en los alvéolos, y el engrosamiento edematoso del espacio perivascular se atenuaron en los ratones tratados con LR17. Aquí se muestra una ilustración típica (x10).  
 (G) Los recuentos bacterianos forman los bazos y la sangre obtenidos 24 horas después del CLP.

25 Figura 6: La modulación de TREM-1 asociada a LR17 protege a los ratones de la mortalidad inducida por CLP.

30 (A-B) Los ratones Balb/c machos adultos (20-23 g) se sometieron a ligadura cecal y punción con anestesia con isoflurano y se agruparon aleatoriamente (n=25-40 por grupo) para recibir una inyección i.p. de LR17, LR17-aleatorio o 0,2 ml de NaCl 0,9 % en los tiempos indicados. La supervivencia se controló durante 1 semana y se analizó mediante la prueba Log Rank. LR17 confirió una protección significativa incluso cuando se administró 24 horas después del inicio de la sepsis.

Figura 7: La modulación de TREM-1 asociada a LR12 protege a los ratones contra la sepsis polimicrobiana.

35 (a) Concentraciones de TNF-a e IL-6 en plasma y BAL.  
 (b) Cuantificación de ARNm de IL-6, TNF-a e IL-10 de pulmón e hígado.  
 (c) Recuento de plaquetas en sangre completa.  
 (d) Examen histopatológico de los pulmones 24 h después de CLP.  
 (ef) Recuentos bacterianos en bazo y sangre obtenidos 24 h después de CLP.  
 40 (g) Curvas de supervivencia después de CLP analizadas por la prueba Log Rank.

Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE. Los valores de p son \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 en comparación con los animales de control.

45 **EJEMPLO:**

Materiales y Métodos

50 Resonancia de Plasmón Superficial. La detección de ligando TREM-1 en sobrenadantes de neutrófilos estimulados por LPS se evaluó uniéndose a una forma soluble recombinante de TREM-1 (rsTREM-1) recubierta en un chip sensor CM5 con el instrumento BIAcore X a 25 °C con un caudal de 5  $\mu$ L/min. La especificidad de unión se verificó mediante competencia con el rsTREM-1 soluble. Se evaluó la inhibición de la unión del ligando TREM-1 por LR17.

55 Péptidos. Basado en las secuencias de TLT-1 y TREM-1 en GenBank | EMBL | DDBJ (números de acceso AY078502, AF534822, AF241219 y AF287008), los péptidos TLT-1 fueron diseñados mimetizando diferentes partes de su dominio extracelular: TLT-1-CDR2 (SAVDRRAPAGRR, sec. con núm. de ident. 2), TLT-1-CDR3 (CMVDGARGPQILHR, sec. con núm. de ident. 3) y una secuencia bien conservada entre TREM-1 y TLT-1: TLT-1-LR17 (LQEEDAGEYGCMDGAR, sec. con núm. de ident. 4), TLT-1-LR12 (LQEEDAGEYGCM, sec. con núm. de ident.: 9), LR6-1 (LQEEDA), LR6-2 (EDAGEY) y LR6-3 (GEYGCM). Se sintetizaron químicamente (Pepscan Presto BV, Lelystad, Holanda) como un péptido amidado terminalmente con COOH para ensayos in vitro e in vivo, y se marcaron con FITC para experimentos de citometría de flujo. Los péptidos correctos se obtuvieron con rendimientos >99 % y fueron homogéneos después de la purificación preparativa, según lo confirmado por espectrometría de masas y cromatografía líquida analítica de alto rendimiento en fase inversa. Estos péptidos estaban libres de endotoxina. Un péptido codificado que contiene los mismos aminoácidos de TLT-1-LR17 pero en un orden de secuencia totalmente diferente se sintetizó y sirvió como péptido de control (TLT-1-LR17-aleatorio: GAEREVCMDEYGALQDG, sec. con núm de ident. 5).

- 5 Aislamiento y estimulación de PMN y monocitos humanos. Se recogieron muestras de sangre periférica humana en EDTA de donantes voluntarios sanos procedentes del personal del laboratorio. Los PMN se aislaron con un gradiente de densidad de diatrizoato de sodio al 13,8 %/Dextran 500 8,0 % (polymorphprep, AbCys). Los monocitos se aislaron por clasificación celular negativa de PBMNC mediante el estuche de aislamiento de monocitos II (Miltenyi). Luego, las células se lavaron dos veces con PBS (BioMerieux) y se resuspendieron en medio completo (RPMI 1640 que contiene 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 0,25 µg/ml de Anfotericina B y 10 % de FCS, Eurobio) antes de la estimulación. La pureza se evaluó mediante citometría de flujo (anti-CD45, -CD14 y -CD66b, Beckman Coulter).
- 10 Aislamiento de plaquetas. Las muestras de sangre de citrato ácido dextrosa se centrifugaron (100 g, 10 min) para obtener plasma rico en plaquetas. Luego se centrifugó PRP (550 g, 10 min) sobre un gradiente de BSA al 36 % (p/vol) y se recogieron las plaquetas de la interfase antes de lavarlas en tampón de sales de Tyrode (Sigma-Aldrich) suplementado con EGTA 5 mM. Para la activación, las plaquetas se incubaron durante 30 minutos con 5 U/ml de trombina (Sigma-Aldrich) o 1 µg/ml *E. coli* LPS (0111:B4, Sigma-Aldrich) a 37 °C y subsecuentemente se fijaron con paraformaldehído al 2 % (p/vol) (PFA, Sigma-Aldrich). El PFA residual se eliminó mediante dos pasos de lavado adicionales en tampón Tyrode. La activación se evaluó mediante anti-CD62P (Beckman Coulter).
- 20 Estimulación Celular. En dependencia del experimento, las células se estimularon en medio completo suplementado con 100 ng/ml de LPS de *E. coli* (0111 B4, Sigma-Aldrich), mAb anti-TREM-1 (R&D systems) y péptidos TLT-1 a diferentes tiempos y concentraciones en placas de 96 pocillos (Greiner Bio One). Los sobrenadantes se recogieron para mediciones de citocinas y las células se sometieron a citometría de flujo o se lisaron para análisis de fosforilación de proteínas y medición de actividad de NFκB.
- 25 Análisis FACS. Las células aisladas (neutrófilos, monocitos o plaquetas) se bloquearon para la unión específica con 10 % de Ig humana (Sigma-Aldrich) durante 1 hora en hielo. Las células se incubaron con péptidos TLT-1 marcados con FITC solubles recombinantes, LP17 marcado con FITC (o péptidos aleatorios marcados con FITC correspondientes), mAb anti-TREM-1 marcado con PE (R & Dsystems), CD62P-FITC, CD66b-PE, CD45-PE, CD14-FITC (todo de Beckman Coulter).
- 30 Medición de la concentración de citocinas. Las citocinas en los sobrenadantes de células humanas estimuladas o plasma de ratón se midieron mediante ELISA (estuches Quantikine ELISA para humanos y ratones, R & Dsystems) y ensayos de panel de citocinas (Estuche de matriz de citocinas humanas Proteome Profiler, Panel A y Estuche de matriz de citocinas de ratón Proteome Profiler, Panel A, R & Dsystems ) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.
- 35 Análisis de fosforilación de proteínas. Los PMN estimulados se lisaron a 1, 3, 10, 30 y 60 minutos con reactivo de extracción PhosphoSafe (Novagen) y se centrifugaron durante 5 minutos a 16,000 g a 4 °C para recoger el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó de acuerdo con el método de Bradford (Pierce). Los lisados se analizaron luego por Western Blot (Criterio XT Bis Tris Gel, 4-12 %, membrana BioRad y PVDF, Millipore), revelados con anti-fosfo-p38 y -pERK1/2 y el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante ( Cell Signaling) y SuperSignal West Femto Substrate (Pierce). Anti-p38 y - ERK1/2 se utilizaron para la normalización. Alternativamente, los PMN se analizaron después de 20 minutos de estimulación para un panel de múltiples proteínas fosforiladas por inmunotransferencia (Human Phospho-Kinase Array, R & Dsystems). La adquisición y los análisis cuantitativos de la densidad de señales se realizaron con el generador de imágenes LAS-4000 y el software Multi-Gauge (Fujifilm).
- 40 Inmunoprecipitación. Las células se lisaron con el reactivo de extracción de proteínas CytoBuster (Novagen). Las muestras se normalizaron por la concentración de proteína total y los lisados se eliminaron previamente antes de realizar la inmunoprecipitación. Los lisados previamente eliminados se incubaron durante la noche a 4 °C con mAb de conejo anti-Bcl10 (Cell Signalling) o conejo-anti-CARD9 (Anticuerpos en línea). Posteriormente, se añadieron perlas de anti-Ig de conejo (eBioscience) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las perlas se lavaron 3 veces, se desnaturalizaron en tampón Laemli durante 5 minutos a 95 °C y se centrifugaron a 16 000 g durante 1 minuto. El sobrenadante que contenía proteínas retenidas se analizó mediante transferencia Western y se reveló con anti-Malt-1 y el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con HRP (Cell Signaling).
- 45 Medición de actividad de NF-κB. Se colectaron células estimuladas, se obtuvieron extractos nucleares mediante un estuche de extracción nuclear y se midió la actividad de NFκB con un estuche de ensayo de factor de transcripción combinado p50/p65 humano (Cayman Chemical) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 50 Evaluación de la producción de ROS. La determinación cuantitativa de la fagocitosis de neutrófilos y el estallido oxidativo se realizó mediante citometría de flujo utilizando el Phagotest y el Bursttest (Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usó una *E. coli* opsonizada marcada con FITC para determinar la actividad fagocítica general (ingestión de una o más bacterias por célula) y la actividad fagocítica celular individual (número de bacterias por célula). Para la evaluación de la actividad de estallido oxidativo, se utilizaron como estimulantes *E. coli* opsonizada sin marcar, fMLP, PMA LPS y plaquetas activadas o no activadas (30:1) y DCFDA se utilizó como sustrato fluorogénico (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 55 Preparación de monocitos derribados silenciados para Trem-1. El silenciamiento de TREM-1 se realizó con el estuche de nucleofector de monocitos humanos (Amaxa) usando secuencias de siARN obtenidas de Qiagen. Los monocitos aislados se electroporaron con ARNip (sin ARNip y con ARNip sin electroporación como control negativo, y con un plásmido
- 60
- 65

indicador GFP para control positivo) y se cultivaron durante 24 horas en medio de nucleofector de monocitos humanos (Amaxa) antes de las estimulaciones. La expresión de TREM-1 se evaluó luego mediante RT-PCR cuantitativa y citometría de flujo 24 horas después de la transfección. Se cambió el medio y se estimularon los monocitos con LPS, mAb anti-TREM-1 y péptidos TLT-1 durante 24 horas. Por lo tanto, se recogió el medio para la medición de citocinas.

Endotoxemia inducida por LPS en ratones. Después de la aprobación del comité ético local, los ratones Balb/c machos (4-6 semanas) se agruparon al azar y se trataron con LPS i.p. en combinación con LR17 (en solución salina normal de 250 µL) o con LR17-aleatorio 1 hora antes o después del desafío con LPS. La viabilidad de los ratones se examinó cada hora, o los animales fueron sacrificados a intervalos regulares. Se colectaron muestras de suero mediante punción cardíaca y se analizaron las citocinas y los niveles de sTREM-1 mediante ELISA (R&Dsystems).

Modelo de sepsis polimicrobiana por ligadura y punción cecal (CLP). Ratones Balb/c machos (4-6 semanas) se anestesiaron con isoflurano. El ciego se expuso a través de una incisión en la línea media abdominal de 1,0 cm y se sometió a una ligadura de la mitad distal seguida de una punción con una aguja G21. Se expulsó una pequeña cantidad de heces de la punción para garantizar la permeabilidad. El ciego se reemplazó en la cavidad peritoneal y la incisión abdominal se cerró en dos capas. Después de la cirugía, se inyectó a todos los ratones sc con 0,5 ml de solución de NaCl al 0,9 % para la reanimación con líquidos. Los animales se agruparon al azar y se trataron LR17 o LR17-aleatorio como control en 250 µl de solución de NaCl al 0,9 % y se administraron i.p. Para determinar el efecto de varias dosis de LR17 en diferentes momentos, los ratones se trataron con 50, 100 o 200 µg de LR17 en HI después de la cirugía, o con 3 inyecciones de 100 µg a las 2, 6 y 24 horas o con 1100 µg en una inyección a las 24 horas después de CLP y luego se monitoreó la sobrevivencia. Cinco animales adicionales por grupo fueron sacrificados bajo anestesia a las 24 h después de CLP para la determinación del recuento bacteriano y los niveles de citocinas. El líquido de lavado peritoneal se obtuvo usando 2 ml de RPMI 1640 (EuroBio), y la sangre se recogió mediante punción cardíaca. Las concentraciones de citocinas plasmáticas se determinaron mediante ELISA (R&Dsystems). Para la evaluación de los recuentos bacterianos, la sangre y el bazo triturado se sembraron en placas en diluciones seriadas en soja triptica complementada con placas de agar de sangre de oveja al 5 %. Después del enchapado, las placas tripticas de agar de soja se incubaron a 37 °C aeróbicamente durante 24 h y anaeróbicamente durante 48 h. Los resultados se expresan como UFC por ml de sangre o por gramo de bazo.

## Resultados

LR17 se une específicamente al ligando TREM-1

Para determinar si sTLT-1 puede unirse específicamente al ligando TREM-1 y, por lo tanto, interferir con la interacción TREM-1/ligando de TREM-1, utilizamos un agonista TREM-1 específico que se conoce que se une y activa TREM-1, mimetizando el acoplamiento de TREM-1 a su ligando. Observamos que, como control, TREM-1 fue capaz de reconocer su ligando (agonista) pero no el péptido LR17-aleatorio de control, y que sTLT-1 y LR17 también pudieron unirse al ligando TREM-1 (Fig. 1A).

Se sabe que las plaquetas humanas expresan constitutivamente el ligando de TREM-1. Por lo tanto, queríamos confirmar directamente la interacción entre sTLT-1 y el ligando TREM-1 al estudiar la fijación de LR17 en las plaquetas. Observamos que LR17 marcado con FITC se une tanto a las plaquetas activadas como a la trombina en reposo. Esta unión disminuyó por la incubación conjunta con LP17, un péptido derivado de TREM-1 que se sabe que se une al ligando TREM-1. Lo contrario es cierto: La unión de LP17 marcado con FITC a las plaquetas se redujo mediante la incubación conjunta con rsTLT-1 o LR17, pero no mediante LR17-aleatorio. LR17 no se unió a neutrófilos o monocitos, se sabe que no expresa el ligando TREM-1 (Fig. 1 B).

Aunque los neutrófilos no expresan un ligando de TREM-1 unido a la membrana, estas células pueden liberar su forma soluble. Mediante el uso de resonancia de plasmón superficial, observamos que los neutrófilos activados por LPS secretan dependientemente del tiempo un ligando de TREM-1 (Fig. 1 C). LR17 pudo bloquear la unión del ligando de TREM-1 a TREM-1 inmovilizado (Fig.1 D), lo que sugiere que sTLT-1 podría interferir con las interacciones TREM-1/ligando de TREM-1.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que LR17 es capaz de unirse y atrapar específicamente el ligando de TREM-1, lo que sugiere que podría actuar como un receptor señuelo e inhibir la interacción TREM-1/ligando de TREM-1.

LR17 inhibe la activación de TREM-1 y disminuye la activación de neutrófilos mediada por TREM-1.

El acoplamiento de TREM-1 en células mieloides conduce a la fosforilación de p38 MAPK y ERK 1/2. Este efecto fue anulado en parte por LR17 (Fig. 2 A). Las matrices de fosfoproteína también mostraron que la fosforilación de proteínas involucradas en la señalización de TREM-1 (mTOR, Lyn, AKT, MSK1/2, MEK 1/2, GSK 3α, RSK y p53) también se redujo en presencia de LR17 (datos no mostrados). TREM-1 señala a través de la asociación con DAP 12, hacia una proteína adaptadora que contiene ITAM. Como la formación de CARD9-BCL10-MALT1 ha demostrado ser esencial para vincular los receptores acoplados a ITAM con la activación de NF-kB aguas abajo, a continuación queríamos examinar el efecto de LR17 en este complejo ensamblaje. Como se esperaba, la activación de TREM-1 se asoció con un aumento de la formación del complejo CARD9-MALT1-BCL10. Este efecto fue revertido por LR17 (Fig. 2B). La vía de señalización

TREM-1 finalmente conduce a la activación de NF- $\kappa$ B. Nuevamente, LR17 disminuyó la actividad de NF- $\kappa$ B inducida por anti-TREM-1 (Fig. 2C). Como señal de la activación celular inducida por TREM, elegimos la producción de ROS. Se ha demostrado que tanto el agonista de TREM-1 como las plaquetas (que expresan el ligando TREM-1) aumentan la producción de ROS por parte de los neutrófilos. Observamos que esta producción se previno en parte en presencia de LR17 (Fig. 2D). Finalmente, LR17 fue capaz de disminuir la producción de citocinas por neutrófilos activados, tanto a nivel de genes como de proteína para TNF- $\alpha$  (Fig. 2E y F), IL-6 e IL-8 (datos no mostrados).

Por lo tanto, estos resultados apoyan aún más el hecho de que LR17 es un inhibidor directo natural de TREM-1.

LR17 exhibe propiedades antiinflamatorias al disminuir la activación celular inducida por LPS- o LPS y aTREM-1.

Se ha demostrado que la modulación TREM-1 reduce la activación de neutrófilos mediada por TLR. El compromiso de TLR4 con la estimulación con LPS conduce a la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de ROS por neutrófilos. De hecho, LR17 disminuyó la fosforilación asociada a LPS (con o sin aTREM-1) de p38 y ERK 1/2 (Fig. 3A), la formación del complejo CARD9-MALT1-BCL10 (Fig. 3B), la translocación de NF- $\kappa$ B (Fig. 3C) y la producción intracelular de ROS (Fig. 3D). LR17 también disminuyó el estallido oxidativo de neutrófilos mediado por E. coli. Por el contrario, sTLT-1 y LR17 no alteraron las propiedades fagocíticas de los neutrófilos (Fig. 3E).

Como se esperaba, aTREM-1 indujo la producción de TNF- $\alpha$  por neutrófilos. Este efecto fue anulado por la adición de LR17. Anti-TREM-1 también actuó de manera sinérgica con LPS para la producción de citocinas: una vez más, esta sinergia fue bloqueada por LR17.

Finalmente, la secreción de TNF- $\alpha$  asociada a LPS por neutrófilos y monocitos se redujo de forma dependiente de la dosis en presencia de LR17, tanto a nivel genético como proteico.  $\alpha$ TREM-1 actuó de manera sinérgica con LPS para inducir la producción de citocinas: una vez más, este efecto fue anulado por la adición de LR17 (Fig. 3F, G, H e I). Lo mismo es cierto para IL-6 e IL-8 (no se muestra). Utilizando matrices amplias de citocinas, confirmamos una disminución de la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, pero también de GRO- $\alpha$ , IL-1, IL-16, MCP-1, MIP-1 $\beta$  y RANTES por LR17. También se confirmó que todos estos efectos se producen en monocitos humanos y con la estimulación de TLR2 (Pam3SK4) (no se muestra).

Para demostrar de manera concluyente que sTLT-1 modula la respuesta inflamatoria inducida por LPS a través de TREM-1, se investigó el efecto de LR17 sobre monocitos tratados con ARNsi para Trem-1. El silenciamiento de Trem-1 se logró en monocitos con más del 90 % de eficiencia de 24 a 96 horas después de la transfección según lo verificado por RT-qPCR. Los monocitos silenciados también se estimularon con LPS/mAb anti-TREM-1: aunque los monocitos silenciados respondieron normalmente a LPS, el mAb anti-TREM-1 no indujo la producción de TNF- $\alpha$ . Concomitantemente, LR17 no mostró ningún efecto sobre la síntesis de TNF- $\alpha$  por monocitos silenciados (Fig. 3I).

Estos resultados apoyan aún más la hipótesis de que sTLT-1 es un inhibidor natural de TREM-1.

LR17 protege a los ratones endotoxémicos de la muerte

A continuación, quisimos dilucidar si sTLT-1 podría tener algunos efectos protectores durante la sepsis. Los ratones Balb/c machos adultos se administraron i.p. con una dosis única de LR17, LR17-aleatorio o NaCl al 0.9 % 60 min antes de la administración de LPS (LD50, 25 mg/kg). Todos los animales tratados con LR17 sobrevivieron (Fig. 4a). Para investigar si el tratamiento con LR17 podría retrasarse hasta después de la administración de LPS, inyectamos LR17 comenzando 1 hora después de la inyección de LPS. Este tratamiento retrasado confirió una protección significativa (Fig. 4a). No hubo muerte tardía durante 10 días, lo que indica que LR17 no solo retrasó el inicio de la letalidad de LPS sino que también proporcionó protección duradera. Todos los ratones de control desarrollaron letargo, piloerección y diarrea antes de la muerte. Por el contrario, los ratones tratados con LR17 se mantuvieron bien cuidados y activos, no tenían diarrea y estaban vivos. Para aclarar el mecanismo por el cual LR17 protegió a los ratones de la letalidad de LPS, determinamos los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 y sTREM-1 de ratones endotoxémicos a las 2 y 4 h. En comparación con los controles, citocinas disminuidas antes y después del tratamiento con LR17 (Fig. 4b-e). El uso de una dosis más alta de LR17 (250  $\mu$ g) no confirió ventaja sobre la dosis de 100  $\mu$ g.

LR17 protege a los ratones contra la sepsis polimicrobiana

Para investigar el papel de LR17 en un modelo más relevante de choque séptico, realizamos experimentos CLP. Los grupos de control comprendían ratones inyectados con solución salina normal o con el péptido de control (LR17-aleatorio). Primero medimos las concentraciones plasmáticas de IL-6 e IL-10 24 horas después de la cirugía. Ambas concentraciones de citocinas disminuyeron en los animales tratados con LR17 (100  $\mu$ g i.p. 2 horas después de la cirugía) (Fig. 5a). La IL-6 e IL-10 también disminuyeron en el líquido de lavado broncoalveolar después del tratamiento con LR17, así como también en el líquido de lavado peritoneal (Fig. 5a). La detección de los niveles plasmáticos de varias citocinas utilizando un conjunto de citocinas mostró una disminución de la concentración de varias otras citocinas inflamatorias importantes (C5a, IL-1ra, IL16, MCP-1, MIP-1a, MIP-2). La activación de la coagulación a menudo ocurre durante la sepsis como parte de la respuesta inflamatoria. Tanto el dímero D como las concentraciones plasmáticas y alveolares de TATc se elevaron notablemente en los ratones CLP. Estas anomalías de la coagulación fueron prevenidas por LR17 (Fig. 5b).

5 A continuación, investigamos si LR17 afecta el reclutamiento local de células tanto en el sitio de infección (el peritoneo) como distalmente (espacio alveolar). De hecho, la infiltración celular se redujo por el tratamiento con LR17 en ambos sitios (Fig. 5c). El estudio histológico reveló lesiones pulmonares graves, es decir, hemorragia intraalveolar, precipitación de proteínas e infiltración de leucocitos en los alvéolos, y engrosamiento edematoso del espacio perivascular en los ratones sépticos. Estas alteraciones se atenuaron en los animales tratados con LR17 (Fig. 5d). Por lo tanto, LR17 evita la infiltración celular masiva y el daño histológico inducido por la peritonitis. Finalmente estudiamos el efecto de LR17 sobre el aclaramiento bacteriano. Como era de esperar, observamos recuentos bacterianos muy altos en los bazo de ratones CLP 24 horas después del inicio de la peritonitis. Además, todos los animales de control fueron encontrados bacteriémicos. Por el contrario, LR17 mejoró el aclaramiento bacteriano y evitó casi por completo la septicemia (Fig. 5e).

10 Por lo tanto, el tratamiento con LR17 fue capaz de modular la respuesta inflamatoria inducida por sepsis tanto local como sistémicamente, y mejorar la eliminación bacteriana.

15 LR17 protege a los ratones de la mortalidad inducida por CLP.

Investigamos si la modulación de la respuesta inflamatoria conferida por LR17 pudo traducirse en una mejora de la supervivencia durante la sepsis. En este modelo CLP de modelo de sepsis polimicrobiana, LR17 confirió una protección significativa dependiente de la dosis contra la letalidad incluso cuando se administraba tan tarde como 24 h después del inicio de la sepsis. Curiosamente, las inyecciones repetidas de LR17 no fueron superiores a la administración de dosis única (Fig. 6).

20 La modulación de TREM-1 asociada a LR12 protege a los ratones contra la sepsis polimicrobiana.

25 LR12 es un 12 aminoácidos derivados de LR17, compuesto por los 12 aminoácidos N-terminales de LR17. Cuando se administró LR12 a ratones sépticos, todavía confería una protección significativa a la inflamación sistémica, broncoalveolar y orgánica (Fig. 7a y b), trastornos de la coagulación (Fig. 7c), disfunción orgánica (Fig. 7d), eliminación bacteriana (Fig. 7e y f) y finalmente mejoró la tasa de supervivencia (Fig. 7g).

30 Estos resultados sugieren que LR12 mantiene el mismo efecto protector y eficacia que LR17.

Los péptidos de 6 aminoácidos (LR6-1, LR6-2 y LR6-3) protegen a los ratones contra la sepsis polimicrobiana.

35 LR6-1, LR6-2 y LR6-3 son 6 aminoácidos derivados de LR17 (Tabla 1). Los péptidos se administran a ratones sépticos como se describe para LR17 y LR12 (véase más arriba).

40 La protección contra la inflamación sistémica, broncoalveolar y orgánica, los trastornos de la coagulación, la disfunción orgánica, el aclaramiento bacteriano y la tasa de supervivencia se evalúan para investigar si estos péptidos mantienen el mismo efecto protector y eficacia que LR12 y LR17.

Referencias:

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

45 Barrow, AD. y otros Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2. *J. Immunol* 172, 5838-5842 (2004).

50 Bleharski, J.R. y otros A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol* 170, 3812-3818 (2003).

Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M.A. & Colonna, M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410, 1103-1107 (2001).

55 Bouchon, A., Dietrich, J. & Colonna, M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol* 164, 4991-4995 (2000).

Gibot, S. Clinical review: role of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 during sepsis. *Crit Care* 9, 485-489 (2005).

60 Gibot, S. y otros Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock. *Infect. Immun* 74, 2823-2830 (2006).

Gibot, S. y otros TREM-1 promotes survival during septic shock in mice. *Eur. J. Immunol* 37, 456-466 (2007).

65 Hara, H. y otros The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* 8, 619-629 (2007).

Haselmayer, P., Grosse-Hovest, L., von Landenberg, P., Child, H. & Radsak, M.P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* 110, 1029-1035 (2007).

5 Haselmayer, P. y otros Signaling Pathways of the TREM-1- and TLR4-Mediated Neutrophil Oxidative Burst. *J Innate Immun* 1, 582-591 (2009).

Kelker, M.S., Debler, E.W. & Wilson, I.A. Crystal structure of mouse triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.76 Å. *J. Mol. Biol* 344, 1175-1181 (2004).

10 Kelker, M.S. y otros Crystal structure of human triggering receptor expressed on 30 myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.47 Å. *J. Mol. Biol* 342, 1237-1248 (2004).

15 Washington, A.V. y otros A TREM family member, TLT-1, is found exclusively in the alpha-granules of megakaryocytes and platelets. *Blood* 104, 1042-1047 (2004).

Washington AV, Gibot S, Acevedo I, Gattis J, Quigley L, Feltz R, De La Mota A, Schubert RL, Gomez-Rodriguez J, Cheng J, Dutra A, Pak E, Chertov O, Rivera L, Morales J,

20 Lubkowski J, Hunter R, Schwartzberg PL, McVicar DW. TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1489-50.

Listado de secuencias

25 <110> INSERM

<120> Péptidos inhibitorios derivados de transcrito de tipo TREM-1 (TLT-1) y usos de los mismos

<130> BI009360 GIBOT

30 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.3

35 <210> 1

<211> 311

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 805 301 T3

1 Met Gly Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Glu Gly Gln  
 5 Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val Leu Gln Ala Pro Val Gly Ser  
 10 Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln  
 15 Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser  
 20 Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr  
 25 Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu  
 30 Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro  
 35 Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu Glu  
 40 Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser Asp  
 45 Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys Ser  
 50 Ile Pro Leu Ile Trp Gly Ala Val Leu Leu Val Gly Leu Leu Val Ala  
 55 Ala Val Val Leu Phe Ala Val Met Ala Lys Arg Lys Gln Gly Asn Arg



ES 2 805 301 T3

<400> 5  
 Gly Ala Glu Arg Glu Val Cys Met Asp Glu Tyr Gly Ala Leu Gln Asp  
 1 5 10 15  
 5  
 Gly  
 <210> 6  
 <211> 6  
 10 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 Leu Gln Glu Glu Asp Ala  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 7  
 Glu Asp Ala Gly Glu Tyr  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 Gly Glu Tyr Gly Cys Met  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 35 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 Leu Gln Glu Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met  
 1 5 10  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido de 6 a 16 aminoácidos que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 4 para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la sec. con núm. de ident.: 8.
2. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 9.
- 10 3. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste de la secuencia de aminoácidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 9.
- 15 4. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste de la secuencia de aminoácidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 8.
5. Un polipéptido de 6 a 16 aminoácidos que consiste de la secuencia de aminoácidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 8 o que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 9.
- 20 6. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5 que consiste de la secuencia de aminoácidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 9.
7. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5 que consiste de la secuencia de aminoácidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 8.
- 25 8. Una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
9. Un plásmido que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
- 30 10. Un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.
11. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la afección inflamatoria es sepsis, sepsis grave, shock séptico, shock hemorrágico, isquemia-reperusión o pancreatitis.
- 35 12. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la afección inflamatoria es choque séptico.
- 40 13. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en donde dicha composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 junto con al menos un excipiente aceptable farmacéuticamente.
- 45 14. Una composición farmacéutica que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o un plásmido de acuerdo con la reivindicación 9, o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10 junto con al menos un excipiente aceptable farmacéuticamente.
- 50 15. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria, en donde dicha composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polipéptido de 6 a 16 aminoácidos que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos con núm. de ident.: 4, en donde dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en la sec. con núm. de ident.: 8, junto con al menos un excipiente aceptable farmacéuticamente.

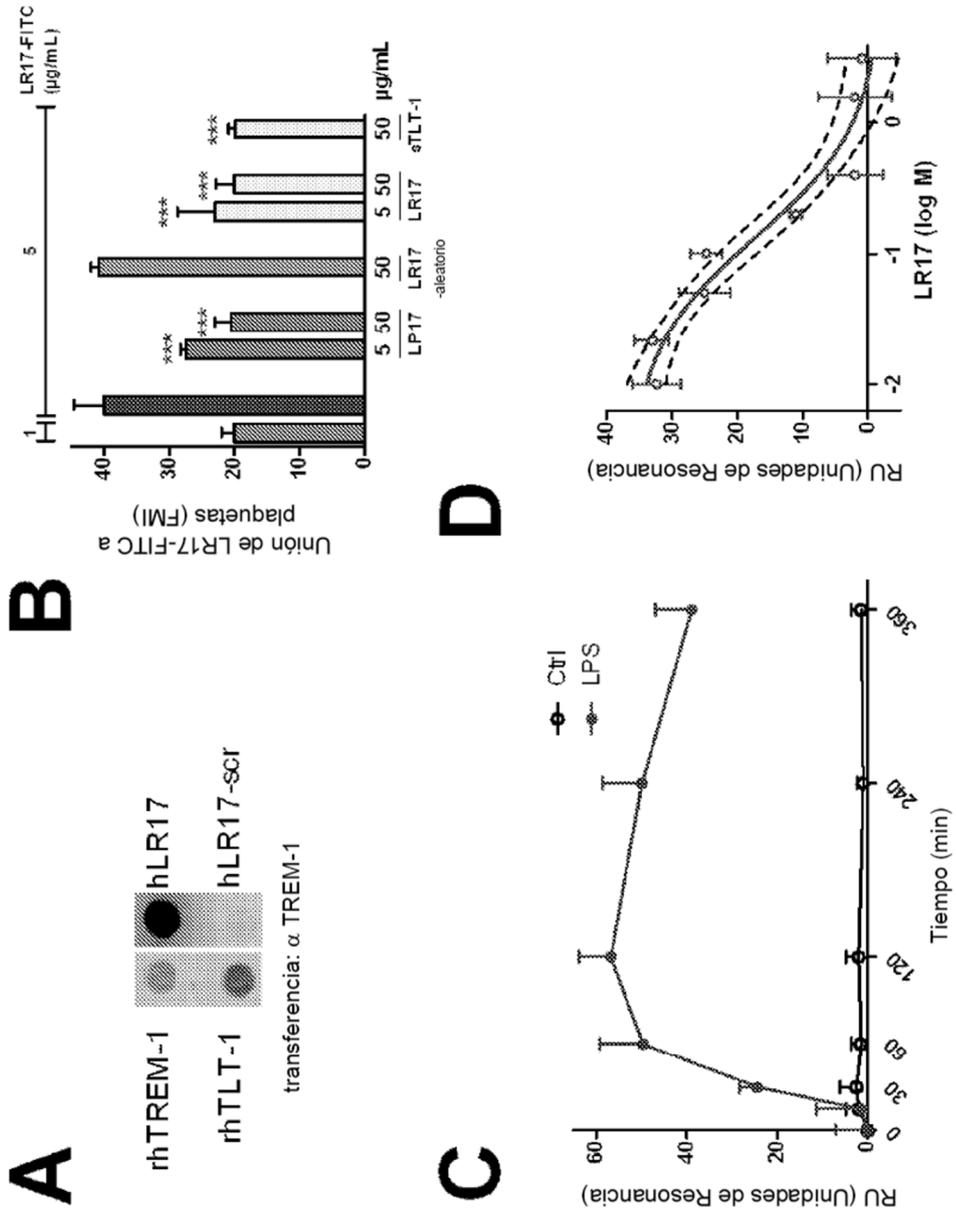


Figura 1

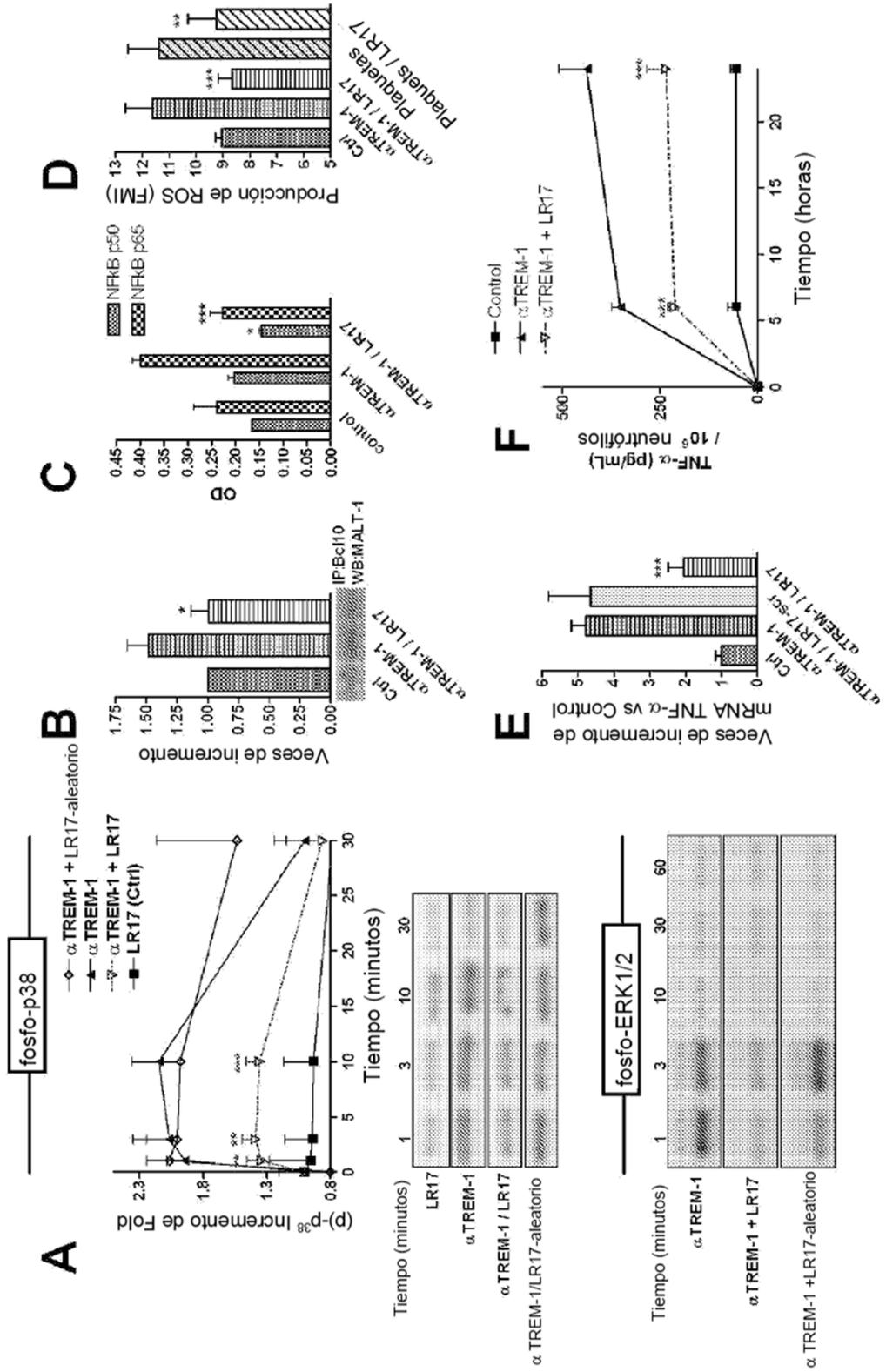


Figura 2

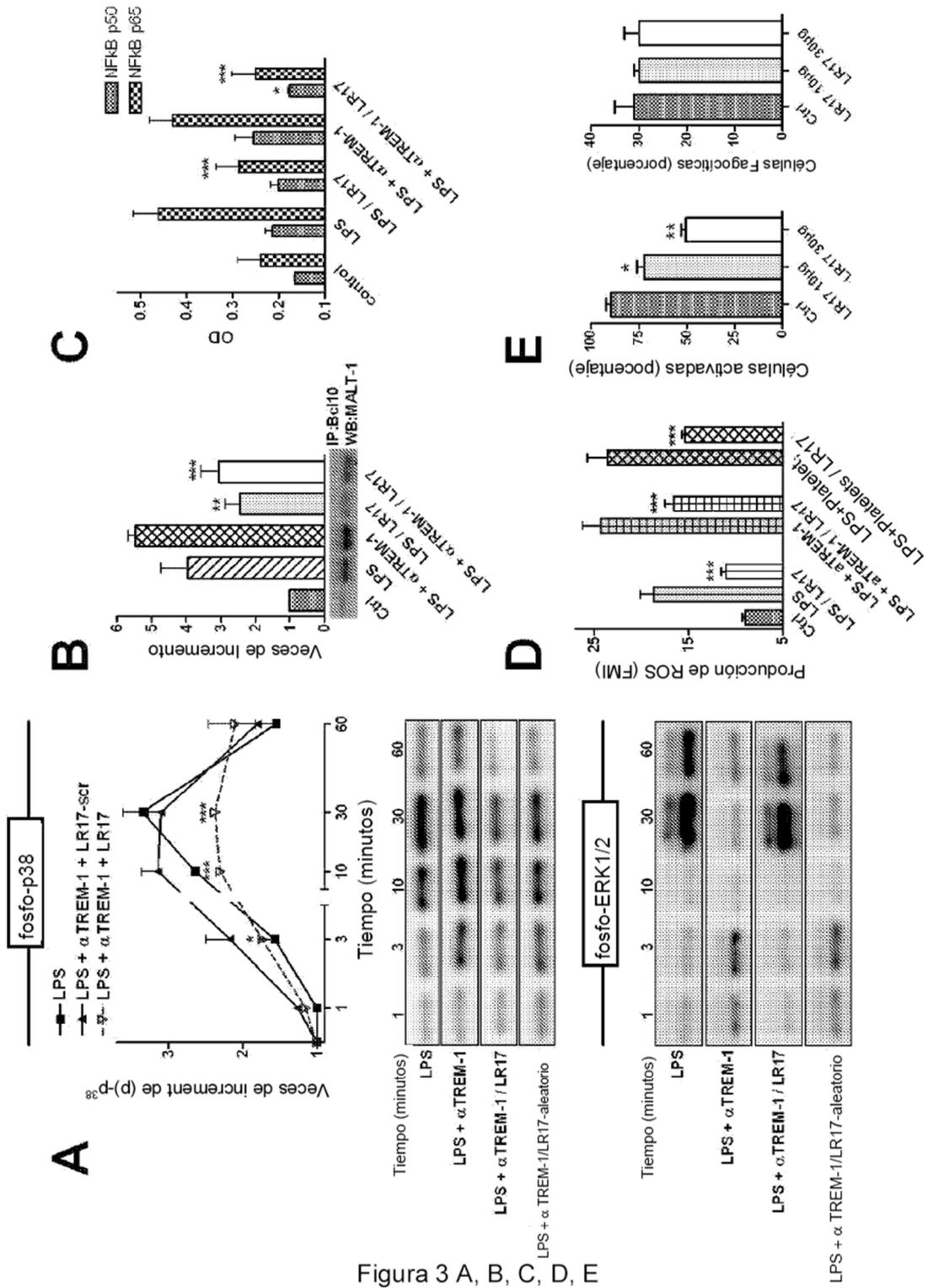


Figura 3 A, B, C, D, E

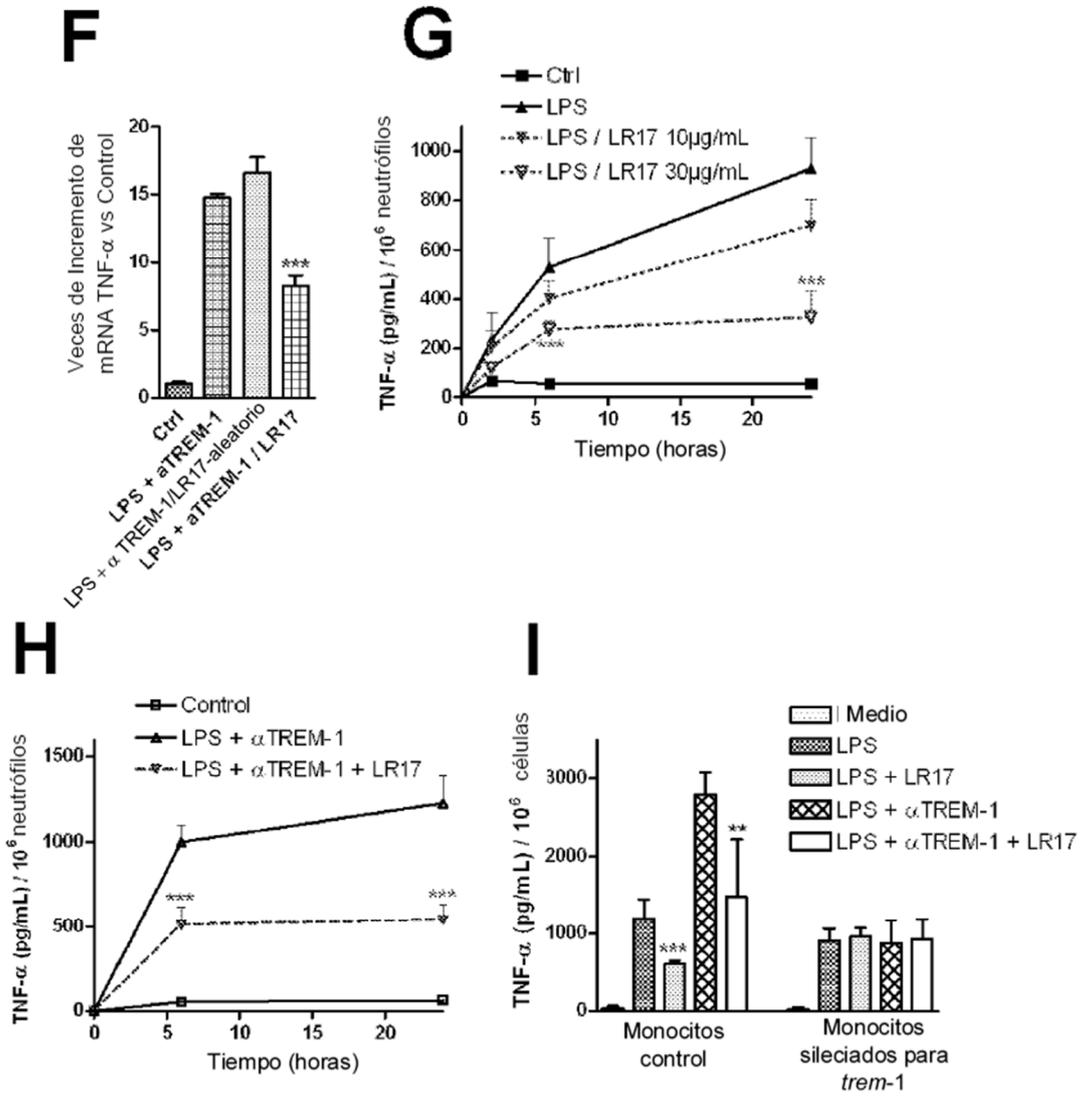


Figura 3 F, G, H e I

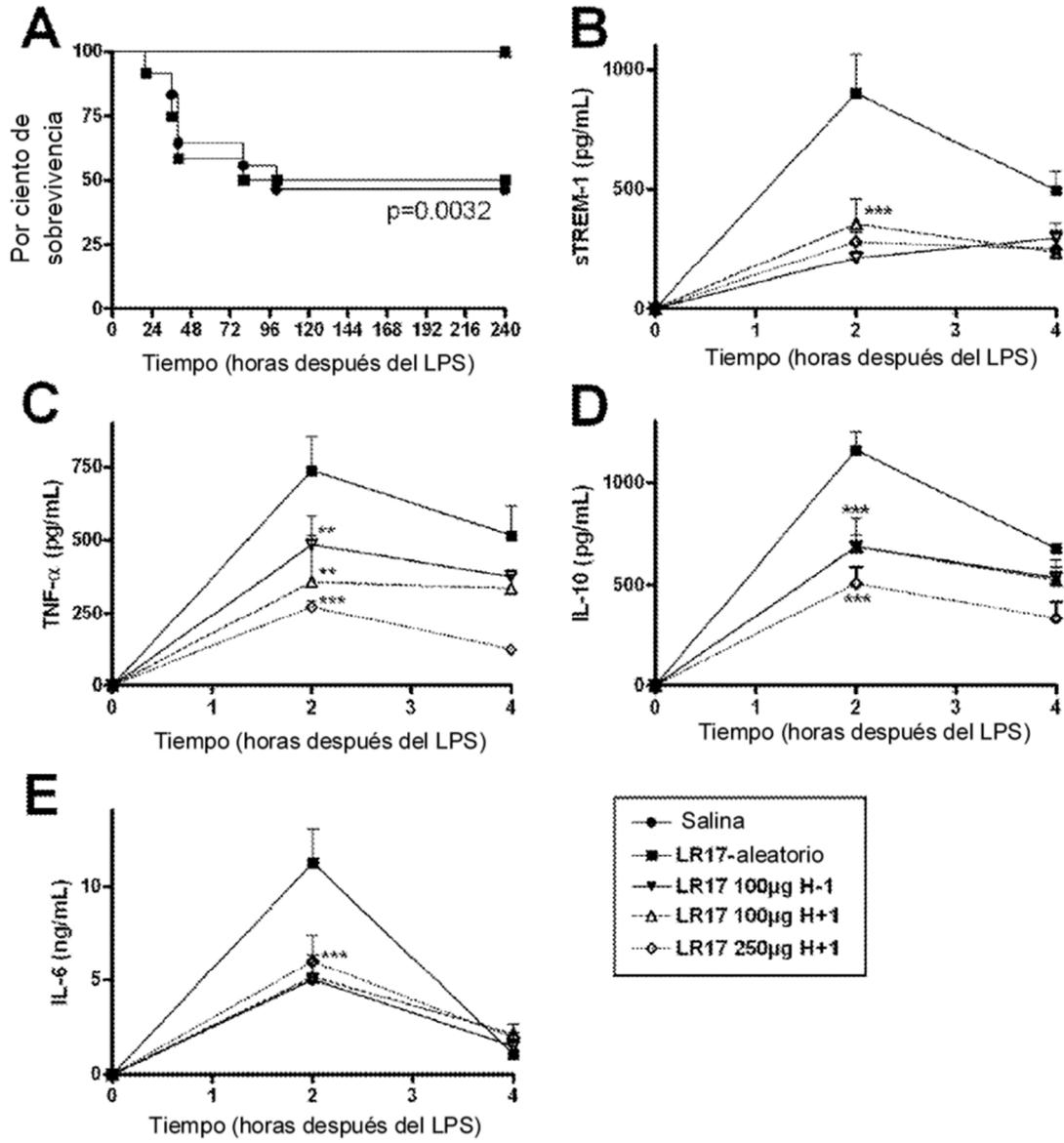


Figura 4

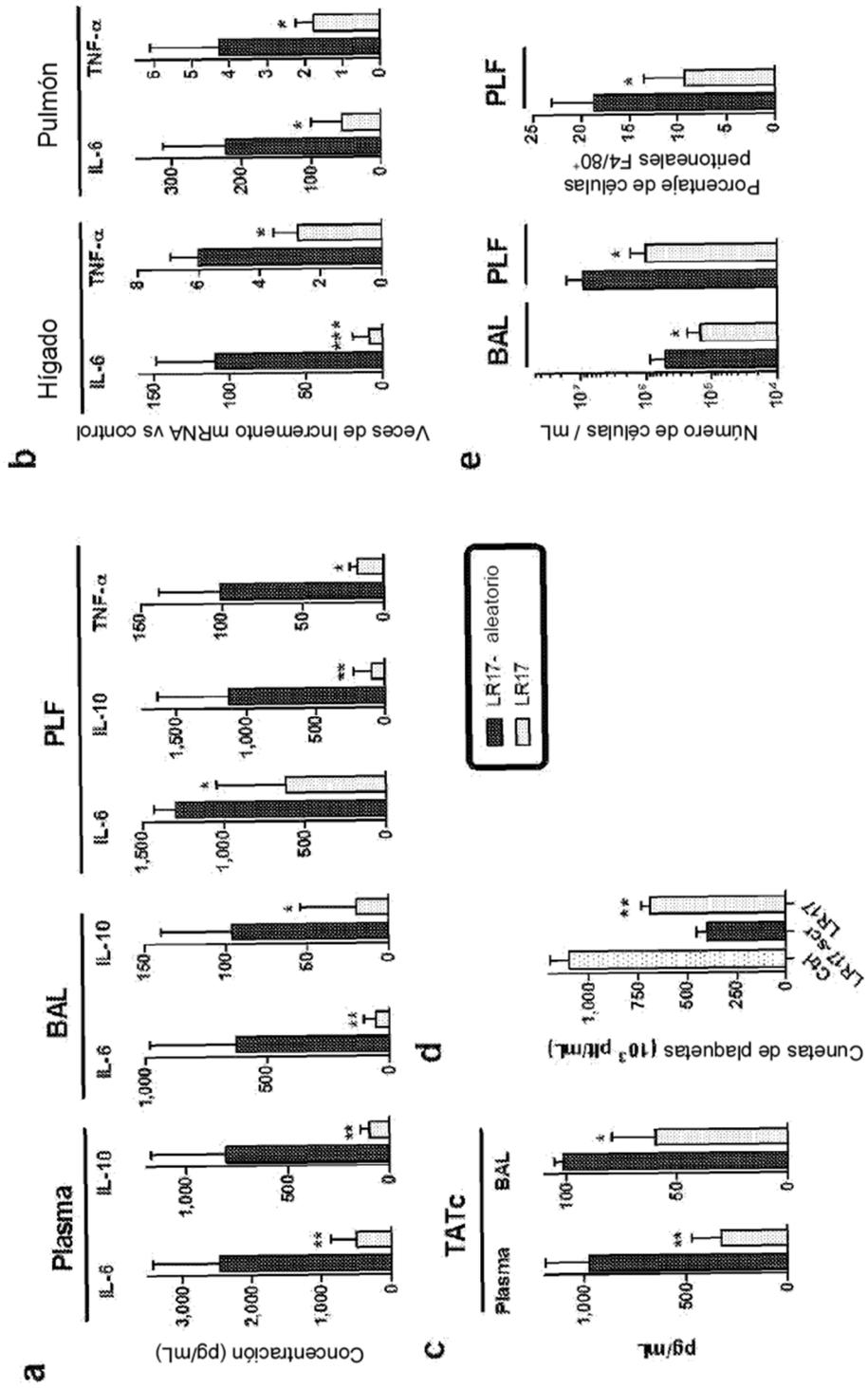


Figura 5 A, B, C, D, E

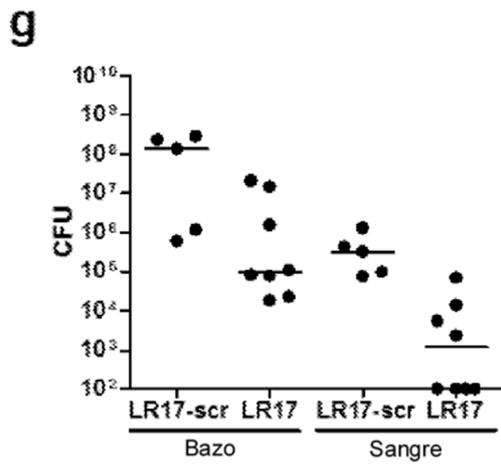
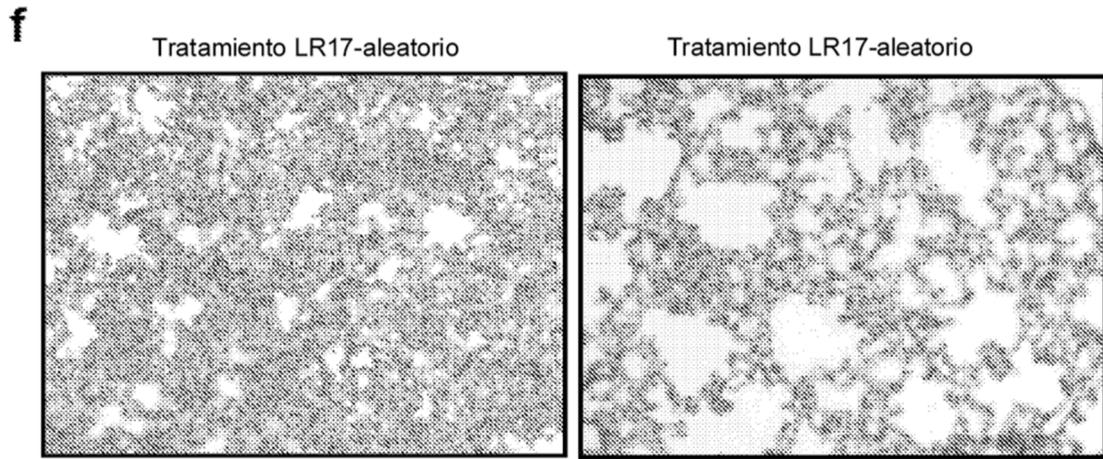


Figura 5 F, G

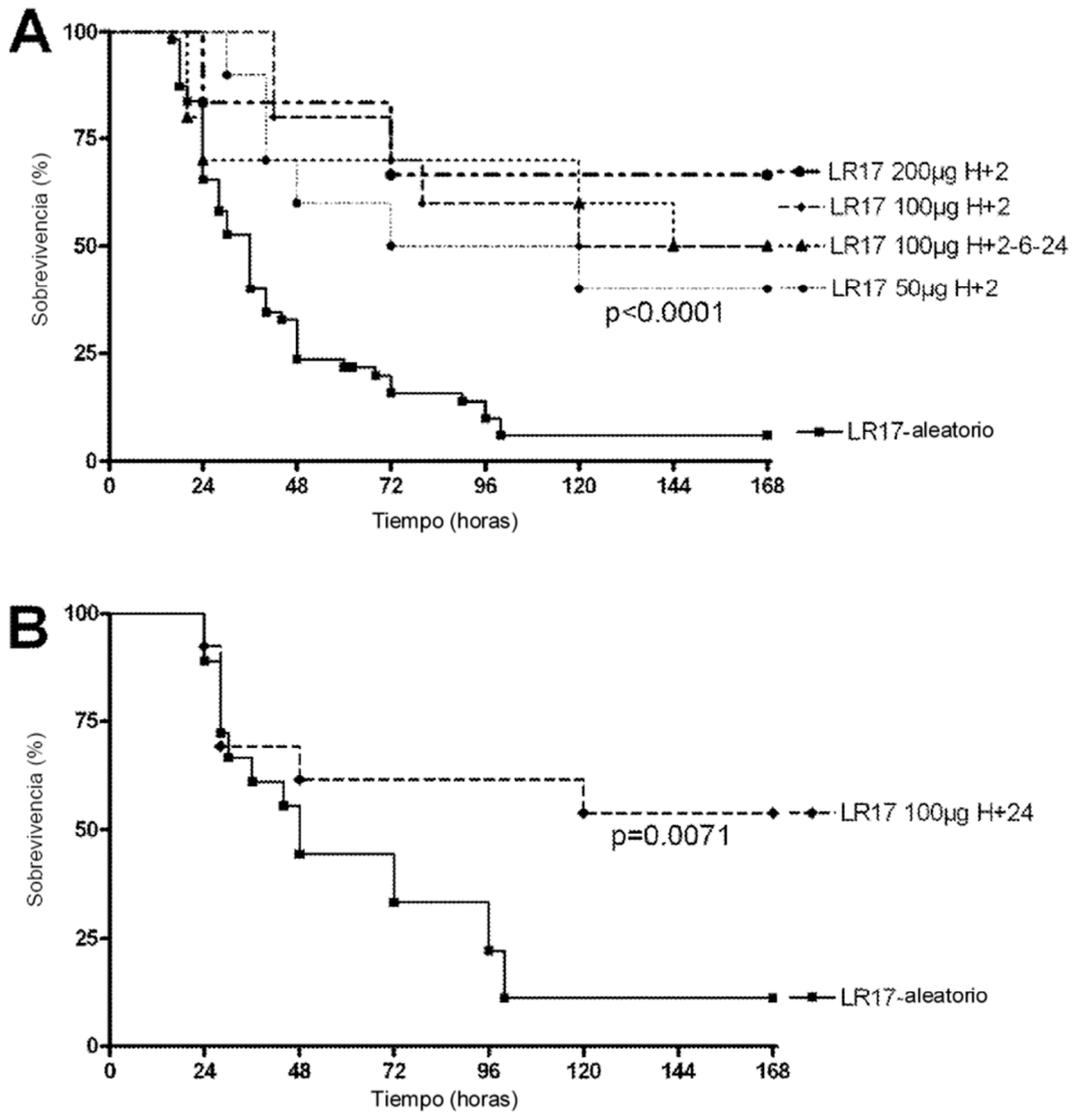


Figura 6

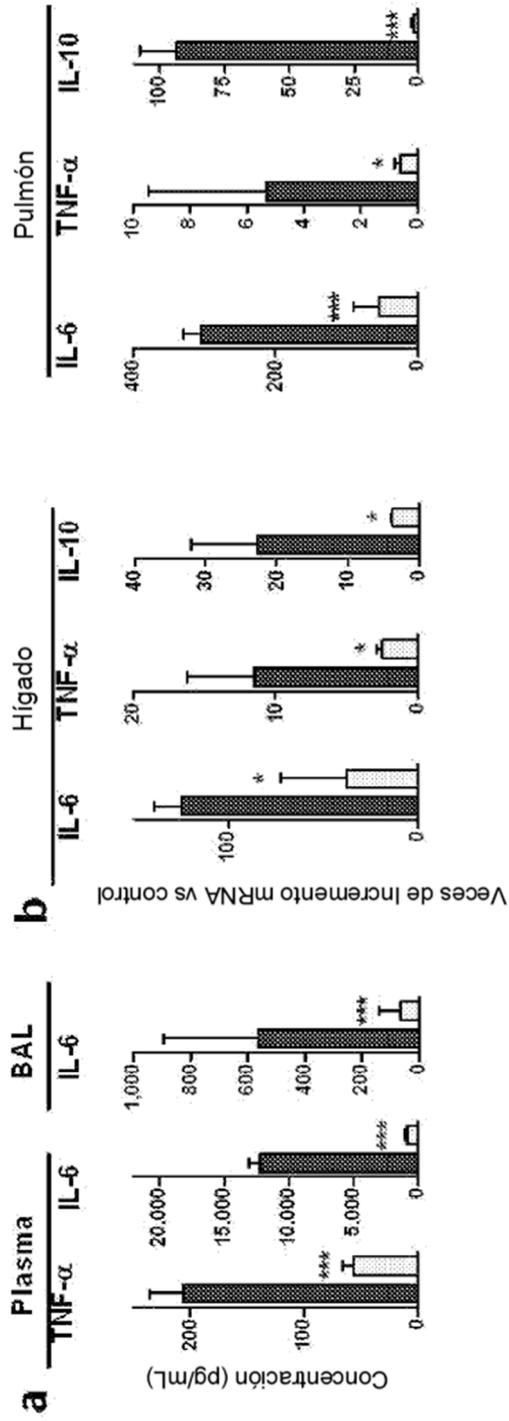


Figura 7 A y B

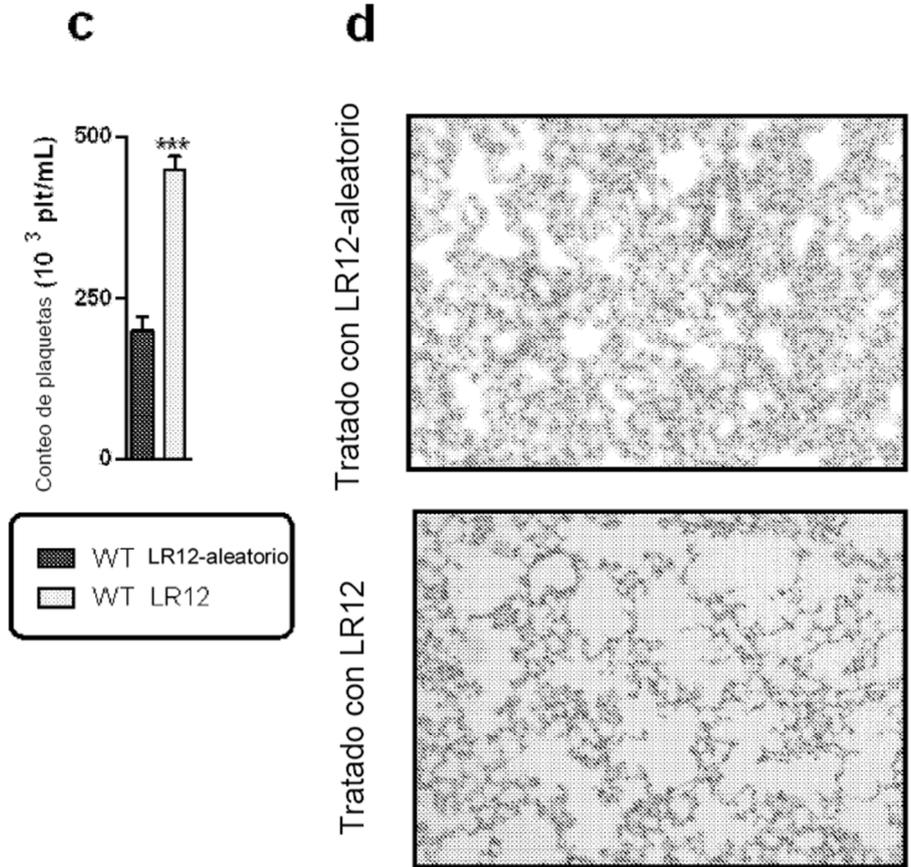


Figura 7 C y D

