

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 925 697**

51 Int. Cl.:

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2017** **PCT/EP2017/053647**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017** **WO17140862**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2017** **E 17710483 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2022** **EP 3416670**

54 Título: **Método para tratar o prevenir septicemia**

30 Prioridad:

17.02.2016 EP 16156186

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

19.10.2022

73 Titular/es:

**ROYAL COLLEGE OF SURGEONS IN IRELAND
(100.0%)
123 St. Stephens Green
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

KERRIGAN, STEVEN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

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

ES 2 925 697 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

Método para tratar o prevenir septicemia

5 Campo técnico

La invención se refiere a cilengitida para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de septicemia. En particular, la invención se refiere a cilengitida para su uso en un método para prevenir o inhibir el desarrollo de septicemia, septicemia grave o choque séptico en un paciente con una infección bacteriana de la sangre.

10 Antecedentes de la invención

En la actualidad no existen tratamientos específicos aprobados para la fisiopatología subyacente de la septicemia y, por tanto, el plan de tratamiento se centra en reducir la infección mediante el uso de una terapia intravenosa agresiva con antibióticos a menudo administrados en altas concentraciones durante largos periodos de tiempo. El uso de antibióticos en el tratamiento de septicemia no es una solución fiable a largo plazo debido a la rápida aparición mundial de cepas de bacterias resistentes a los antibióticos. Según el informe más reciente de la Organización Mundial de la Salud sobre la resistencia a los antimicrobianos, es inminente una era "post-antibiótica", lo que sugiere que el uso de antibióticos en la septicemia llegará pronto de manera abrupta a su fin. Ante la sospecha de que está desarrollándose una septicemia, el tratamiento con antibióticos debe comenzar inmediatamente, preferiblemente en el plazo de las primeras seis horas o antes. Inicialmente, el paciente recibirá antibióticos de amplio espectro, que son eficaces contra una variedad de bacterias. Estos antibióticos incluyen gentamicina, cefepima, piperacilina o meropenem. Una vez que el hemocultivo da positivo para la identificación del tipo específico de bacterias (Gram negativas o Gram positivas), pueden administrarse los siguientes antibióticos. Gram negativas: amikacina o tobramicina, Gram positivas: vancomicina. Todos los antibióticos se administran por vía intravenosa.

Se han desarrollado modelos animales de septicemia en un esfuerzo por crear sistemas reproducibles para estudiar la evolución de la enfermedad, la patogénesis y las pruebas preliminares de posibles agentes terapéuticos. Sin embargo, el beneficio demostrado de un agente terapéutico en modelos animales de septicemia rara vez se ha traducido en éxito en los ensayos clínicos en humanos. Por ejemplo, Xigris, se ha retirado recientemente del mercado debido a su limitada eficacia. Varios motivos podrían explicar estos fracasos, pero el más destacado es la aplicación de una teoría basada en observaciones incorrectas o incompletas en los modelos animales. Normalmente, los animales (los ratones en particular) no desarrollan septicemia a menos que se les obligue administrándoles altos niveles de bacterias no comensales. Debido a la falta de aplicabilidad de los modelos animales, los investigadores se han centrado en la interacción entre las bacterias y la sangre humana y las células endoteliales, aunque se han planteado cuestiones importantes sobre el enfoque para investigar estas interacciones.

Ningún grupo ha considerado hasta la fecha los antagonistas de $\alpha V\beta 3$.

Una publicación de Pranita P. Sarangi, *et al.*, (SHOCK, vol. 38, n.º 2, 1 de agosto de 2012) investigó el efecto de un péptido RGD sobre la beta-1-integrina en un modelo de ratón de endotoxemia y septicemia. Esta divulgación difiere de la presente invención al menos en que el péptido RGD usado por los autores no era un antagonista de $\alpha V\beta 3$.

C.C. Hsu, *et al.*, (Journal of Thrombosis and Haemostasis, vol. 9, n.º 3, 1 de marzo de 2011) investigaron el efecto de la rodostomina sobre la endotoxemia inducida por LPS en un modelo de ratón. Esta publicación no se busca los métodos para prevenir o inhibir el desarrollo temprano de septicemia en un individuo y no hay ninguna discusión en cuanto al uso de un antagonista de $\alpha V\beta 3$. El antagonista de $\alpha V\beta 3$ de la presente invención actúa impidiendo la adhesión de las bacterias a las células endoteliales. El modelo utilizado por los autores de Hsu *et al.* implica LPS aislado y no bacterias y, como tal, Hsu *et al.* no han demostrado los efectos de un antagonista de $\alpha V\beta 3$ sobre la septicemia, en particular sobre la septicemia temprana, ya que las bacterias en sí no están presentes. Además, el modelo utilizado por Hsu *et al.* no es un modelo de septicemia temprana o de septicemia en desarrollo que no implique una sobrecarga de LPS.

Un objeto de la invención es superar al menos de los problemas mencionados anteriormente.

60 Breve descripción de la invención

El solicitante ha descubierto que las células endoteliales vasculares humanas, en condiciones de cizalladura, regulan por incremento la expresión de determinados receptores extracelulares, incluyendo el receptor de integrina $\alpha V\beta 3$. Además, el solicitante ha descubierto que los patógenos humanos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se unen a las células endoteliales vasculares humanas en condiciones de cizalladura mediante la interacción con el receptor de integrina $\alpha V\beta 3$ endotelial vascular. En particular, el factor A de aglutinación de S.

aureus se une al fibrinógeno, que está reticulado a $\alpha V\beta 3$, y el lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* se une directamente a $\alpha V\beta 3$. Los inventores han descubierto ahora que, de hecho, la proteína A de la membrana externa de *Escherichia coli* se une a la integrina principal de las células endoteliales, $\alpha V\beta 3$. El solicitante también ha descubierto que el bloqueo del receptor con un antagonista de $\alpha V\beta 3$, tal como cilengitida, provoca una reducción dependiente de la dosis en la adhesión de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas a las células endoteliales vasculares. Como la adhesión de bacterias a las células endoteliales vasculares es un acontecimiento crítico en el desarrollo de septicemia bacteriana, en particular la evolución de la infección sanguínea a la septicemia, la septicemia grave y el choque séptico, la invención se refiere al tratamiento o la prevención de septicemia mediante la administración, idealmente la administración intravenosa, de un antagonista de $\alpha V\beta 3$ a un paciente. Además, como el bloqueo de la integrina $\alpha V\beta 3$ endotelial vascular con un antagonista de $\alpha V\beta 3$ provoca una reducción de la adhesión de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, la intervención terapéutica no requiere que se midan previamente los cultivos de sangre y puede iniciarse tan pronto como se sospeche o se haya detectado una infección sanguínea.

La invención es tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la invención se refiere a cilengitida para su uso en el tratamiento o la prevención de septicemia en un paciente, en la que la cilengitida se administra al paciente por vía intravenosa.

En una realización, el paciente tiene, o se sospecha que tiene, una infección bacteriana de la sangre.

En una realización, el uso de la invención es específicamente para la prevención o inhibición temprana del desarrollo de septicemia en un paciente que tiene o se sospecha que tiene una infección bacteriana de la sangre.

En una realización, el uso de la invención es específicamente para la prevención o inhibición temprana del desarrollo de septicemia grave o choque séptico en un paciente que tiene o se sospecha que tiene septicemia o una infección de la sangre.

En una realización, el uso de la invención es específicamente para el tratamiento de septicemia grave o choque séptico en un paciente.

En una realización, el uso de la invención comprende adicionalmente el tratamiento con una intervención seleccionada de: antibióticos intravenosos; líquidos intravenosos; e intervención específica de órganos.

En una realización, se administra al paciente una dosis de menos de 10 mg/m². En una realización, se administra al paciente una dosis de menos de 1 mg/m².

Se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de cilengitida y un antibiótico normalmente formulado para su administración intravenosa. En una realización, el antibiótico es un antibiótico de amplio espectro. Los ejemplos incluyen gentamicina, cefepima, piperacilina o meropenem. En una realización, el antibiótico es un antibiótico específico para bacterias Gram negativas. Los ejemplos incluyen amikacina o tobramicina. En una realización, el antibiótico es un antibiótico específico para bacterias Gram positivas. Los ejemplos incluyen vancomicina. En una realización, la composición farmacéutica comprende menos de 10 mg/m². En una realización, se administra al paciente una dosis de menos de 1 mg/m².

Se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir la septicemia en un paciente, que comprende la administración intravenosa de cilengitida tal como se describe en el presente documento. En una realización, el método es para la prevención o inhibición temprana del desarrollo de septicemia en un paciente que tiene o se sospecha que tiene una infección bacteriana de la sangre. En una realización, el método es para la prevención o inhibición temprana del desarrollo de septicemia grave o choque séptico en un paciente que tiene o se sospecha que tiene septicemia. En una realización, el método es para el tratamiento de septicemia grave o choque séptico en un paciente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. *El efecto de la cizalladura y las condiciones necesarias para la unión de bacterias a células endoteliales humanas.* Se hicieron crecer células endoteliales humanas o bien de manera estática (A) o bien en condiciones de cizalladura fisiológica de 10 dyn/cm² (B). Se permitió que *S. aureus* se adhiriera a las células endoteliales humanas sometidas a cizalladura en ausencia o presencia de plasma humano (C) y/o en ausencia (D) o presencia (E) de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Una vez establecidas estas condiciones, se investigó la capacidad de *S. aureus* de unirse a las células endoteliales humanas en condiciones estáticas o de cizalladura en presencia de plasma y TNF α (F). Los resultados indican que *S. aureus* se une significativamente más a las células endoteliales humanas sometidas a cizalladura en presencia de plasma y TNF α .

Figura 2. *Identificación de la principal proteína de la pared celular de S. aureus que se une a las células endoteliales humanas sometidas a cizalladura.* *S. aureus* se unió a las células endoteliales humanas en presencia de plasma humano y TNF α . El uso de una cepa deficiente en la expresión de la proteína A expresada en la superficie de la bacteria no afectó a la unión de *S. aureus*, sin embargo, el uso de una cepa deficiente en la expresión de la proteína principal de la pared celular, el factor de aglutinación A, redujo significativamente la unión (A). Se usaron transferencias puntuales para confirmar la falta de expresión de la proteína A y del factor de aglutinación A (B). *L. lactis* es un excelente huésped sustituto usado anteriormente para determinar la función de las proteínas de interés de *S. aureus*. La sobreexpresión de la proteína A en el huésped sustituto *L. lactis* no logró restablecer la unión a las células endoteliales humanas. La sobreexpresión del factor de aglutinación A en el huésped sustituto *L. lactis* aumentó significativamente la unión a las células endoteliales humanas (C). Se usaron transferencias puntuales para confirmar la sobreexpresión de ClfA y de la proteína A, respectivamente (D). Estos resultados sugieren que la principal proteína de la pared celular, ClfA, es fundamental para la unión de *S. aureus* a las células endoteliales humanas.

Figura 3. *Identificación del papel de las proteínas plasmáticas humanas en la unión del factor de aglutinación A de S. aureus a las células endoteliales humanas.* La unión de *L. lactis* que expresa ClfA a las células endoteliales humanas se redujo significativamente cuando se retiraron las proteínas plasmáticas de ClfA (A). La adición de IgG sólo no logró restablecer la unión de ClfA de *L. lactis* a las células endoteliales humanas. La adición de fibrinógeno sólo restableció completamente la unión de *L. lactis* a las células endoteliales humanas (B). La delección de los aminoácidos de ClfA (C) críticos para la unión al fibrinógeno redujo significativamente la interacción con las células endoteliales humanas (D). Estos resultados sugieren que el fibrinógeno es clave para que ClfA se reticule y se una a las células endoteliales humanas.

Figura 4. *Liberación de calcio intracelular en células endoteliales humanas como resultado de la unión de ClfA/fibrinógeno.* Las células endoteliales humanas no infectadas en reposo no liberan calcio intracelular (A y D). Sin embargo, tras la unión de ClfA/fibrinógeno a las células endoteliales humanas se produce un pico de liberación de calcio a aproximadamente 4 minutos tras la infección (B y D). El uso de una cepa deficiente en la expresión de ClfA no pudo desencadenar la señal intracelular que da lugar a la liberación de calcio (C y D). Estos resultados sugieren que tras la unión de ClfA/fibrinógeno a las células endoteliales humanas se genera una señal intracelular.

Figura 5. *Movilización de los cuerpos de Weibel Palade y secreción del factor de Von Willebrand tras la unión de ClfA/fibrinógeno.* Las células endoteliales humanas no infectadas en reposo (A y D) o las células de *L. lactis* transfectadas de manera simulada (B y D) no movilizan los cuerpos de Weibel Palade ni secretan el factor de Von Willebrand en la superficie de las células endoteliales. La sobreexpresión de ClfA en *L. lactis* condujo a la movilización de los cuerpos de Weibel Palade y a la secreción de vWf sobre la superficie de las células endoteliales humanas (C y D).

Figura 6. *Identificación del receptor de las células endoteliales que reconoce ClfA de S. aureus y fibrinógeno que medió la interacción.* Tras la activación con células endoteliales humanas con baja concentración de TNF α , se regula por incremento significativamente α V β 3 (A). La unión de *L. lactis* que expresa ClfA se redujo significativamente tras el pretratamiento de las células endoteliales humanas con un inhibidor de α V β 3, la cilengitida (B). El pretratamiento del receptor α V β 3 purificado con cilengitida también inhibió significativamente la unión de ClfA de *L. lactis* (C). Estos resultados sugieren que α V β 3 es el receptor responsable de la unión al fibrinógeno y de la reticulación con ClfA de *S. aureus*.

Figura 7. *Modelo de perfusión mesentérica venosa in vivo para demostrar que la cilengitida inhibe la adhesión de bacterias a las células endoteliales.* *S. aureus* de tipo natural se adhirió a células endoteliales murinas activadas (A). El uso de una cepa deficiente en la expresión de ClfA se adhirió significativamente menos a las células endoteliales (B y D). *S. aureus* no se adhirió significativamente a células endoteliales murinas en presencia de cilengitida administrada por vía intravenosa (C y E).

Figura 8. *Efecto de S. aureus sobre la proliferación de células endoteliales humanas.* Las células endoteliales humanas proliferan durante 24 horas en medios de crecimiento (C y F). La adición de *S. aureus* a las células endoteliales redujo significativamente la proliferación de células endoteliales humanas durante un periodo de 24 horas (D y G). El uso de una cepa deficiente en la expresión de ClfA recuperó significativamente la capacidad de *S. aureus* de inhibir la proliferación de células endoteliales humanas (E). Igualmente, la adición de cilengitida a las células endoteliales humanas también recuperó significativamente la capacidad de *S. aureus* de inhibir la proliferación (H).

Figura 9. *Efecto de S. aureus sobre la apoptosis de células endoteliales humanas.* Basándose en la observación de que *S. aureus* inhibe la proliferación de células endoteliales humanas, se investigó si esto se debe a la apoptosis. Las células endoteliales humanas sanas tienen niveles bajos de apoptosis, pero al añadir *S. aureus* se observa una apoptosis significativa. El uso de una cepa deficiente en la expresión de ClfA redujo significativamente la apoptosis inducida por *S. aureus* (A). La adición de cilengitida a las células endoteliales humanas también redujo significativamente la capacidad de *S. aureus* de inducir la apoptosis (B).

Figura 10. *El efecto de S. aureus sobre la permeabilidad de las células endoteliales humanas.* Si las células endoteliales humanas se vuelven apoptóticas, puede producirse una alteración de la función de barrera. Las células endoteliales humanas no infectadas forman uniones estrechas que impiden el paso de fluido a través de la capa endotelial. La adición de *S. aureus* altera esta barrera y provoca un paso significativo de fluido a través de la monocapa de células. El uso de una cepa deficiente en la expresión de ClfA redujo significativamente esta alteración en la permeabilidad de la barrera. Del mismo modo, la adición de cilengitida a las células endoteliales humanas también redujo significativamente la permeabilidad de la barrera tras la infección por *S. aureus*.

Figura 11. *Modelo de la interacción de S. aureus con células endoteliales humanas.* El factor A de aglutinación de *S. aureus* se une al fibrinógeno plasmático soluble. Éste, a su vez, reticula las bacterias a $\alpha V\beta 3$ expresada en células endoteliales. Una vez unido, se genera una señal intracelular que provoca un aumento significativo del calcio y la secreción del factor de Von Willebrand. Señales adicionales dan como resultado pérdida de proliferación, apoptosis inducida y aumento de la permeabilidad vascular. En conjunto, estos cambios provocan una desregulación de la función normal de las células endoteliales. La adición de cilengitida reduce significativamente todos estos mensajes disfuncionales.

Figura 12. La adición de cilengitida no provoca toxicidad en células endoteliales humanas.

Figura 13. *Unión de Escherichia coli a células endoteliales sometidas a cizalladura en condiciones estáticas.* Las células endoteliales se sometieron a cizalladura para reproducir el estado fisiológico en que se encuentran en la vasculatura humana. Las células endoteliales se fijaron, se permeabilizaron y se incubaron con un anticuerpo contra α -actina (primario) y anticuerpo conjugado con Alexa Fluor® 488 (secundario). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las imágenes se adquirieron con un microscopio de fluorescencia. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Las células endoteliales hechas crecer en condiciones estáticas muestran una orientación aleatoria (A); mientras que las células endoteliales hechas crecer en condiciones de cizalladura muestran una alineación en la dirección del flujo (B). En consonancia con esto, se demostró que la expresión de la VE-cadherina, determinada mediante inmunotransferencia de tipo Western de los homogeneizados de proteínas de las células endoteliales estáticas y sometidas a cizalladura, se regula por incremento en células endoteliales sometidas a cizalladura (C). Se sometió a prueba la capacidad de 9 cepas clínicas de *E. coli* de unirse a las células endoteliales sometidas a cizalladura y todas las cepas se unieron en distintos grados (D). Se usó la cepa CFT073 de *E. coli* como cepa representativa en todos los experimentos. En consonancia con observaciones anteriores, *S. aureus* (control) necesita plasma para unirse con éxito a las células endoteliales sometidas a cizalladura, pero *E. coli* parece unirse en ausencia o en presencia de una proteína plasmática. Estos datos sugieren que *E. coli* puede unirse a células endoteliales sometidas a cizalladura en ausencia de proteínas plasmáticas, lo que contrasta con la unión de *S. aureus* a células endoteliales, que depende de las proteínas plasmáticas.

Figura 14. *Escherichia coli se une a la principal integrina $\alpha V\beta 3$ expresada en células endoteliales.* Se investigó el efecto de la inhibición de la integrina $\alpha V\beta 3$ en la unión de *E. coli* a las células endoteliales. Los resultados demuestran que el inhibidor selectivo de integrina $\alpha V\beta 3$, cilengitida (0,05 μ M), inhibió significativamente la unión de *E. coli* a células endoteliales usando un ensayo estático (A) o cuando *E. coli* se perfunde sobre las células endoteliales sometidas a cizalladura a 10 dyn durante 5 minutos (B). Estos resultados demuestran que cilengitida inhibió la unión de *E. coli* a células endoteliales.

Figura 15. *La proteína A de la membrana externa de Escherichia coli se une a la integrina principal de las células endoteliales, $\alpha V\beta 3$.* Usando una cepa deficiente en LPS se encontró que la unión a las células endoteliales no se veía afectada, lo que sugiere que el LPS no es el componente responsable de anclar las bacterias a las células endoteliales (A). Para investigar si las proteínas sensibles a tripsina eran responsables de la unión a células endoteliales, se pretrataron las células con tripsina y la unión se redujo significativamente (B). Se usó un enfoque bioinformático para buscar en el genoma de *E. coli* las proteínas de superficie que contienen una secuencia RGD. Se identificaron casi 20 proteínas con una secuencia RGD o KGD, pero sólo 10 se expresaban en la superficie celular (E). La proteína de membrana externa A ompA se delecionó de la cepa original CFT073 y se reintrodujo en la cepa con genes inactivados para eludir las preocupaciones sobre los efectos pleiotrópicos. La capacidad de la cepa deficiente en la expresión de ompA de unirse a las células endoteliales se redujo significativamente usando tanto un ensayo estático (C) como cuando se perfundieron las bacterias sobre las células endoteliales sometidas a cizalladura (D). La unión se restableció cuando se usó la cepa complementada, lo que sugiere que ompA desempeña un papel clave en la unión a las células endoteliales (C+D). Estos resultados demuestran que la proteína de membrana externa A se expresa de manera ubicua en la superficie de las cepas de *E. coli* y expresa el motivo de reconocimiento de integrinas RGD. La delección de ompA reduce significativamente la capacidad de *E. coli* de unirse a las células endoteliales.

Figura 16. *La unión de ompA de Escherichia coli a $\alpha V\beta 3$ provoca un aumento de la permeabilidad en células endoteliales.* Uno de los signos característicos de la septicemia es la permeabilidad vascular aumentada. Se investigó el efecto de la unión de *E. coli* a células endoteliales sobre la permeabilidad. Tras la unión de *E. coli*, se

produjo un aumento del 30% en la permeabilidad y la cepa deficiente en *ompA* reduce significativamente la permeabilidad. La adición de la cepa *ompA* complementada dio lugar a un aumento de la permeabilidad comparable al control de *E. coli* original. Lo más importante es que el aumento de la permeabilidad inducido por *E. coli* se redujo significativamente tras la preincubación $\alpha V\beta 3$ da como resultado una señal que desencadena un aumento de la fuga de fluidos y la permeabilidad. Estos datos ilustran que la unión de *E. coli* a células endoteliales da como resultado un aumento significativo de la permeabilidad (~30%). El uso de una cepa deficiente en *ompA* o la preincubación de las células endoteliales con cilengitida reduce significativamente la permeabilidad.

Figura 17. La unión de *ompA* de *Escherichia coli* a $\alpha V\beta 3$ provoca la pérdida de la proteína de unión estrecha y el aumento de la apoptosis. El aumento de la permeabilidad se debe a la separación de las células endoteliales. Para investigarlo, se evaluó la formación de uniones estrechas. La inmunotinción para VE-cadherina demostró la formación de uniones estrechas en ausencia de infección (A), sin embargo, hubo una pérdida de conexiones tras la infección por *E. coli* (B). El uso de la cepa deficiente en *ompA* recuperó la formación de uniones estrechas de VE-cadherina (C). La cepa complementada también condujo significativamente a la pérdida de la formación de uniones estrechas (D). Finalmente, el pretratamiento de las células endoteliales con cilengitida también condujo a la recuperación de la formación de uniones estrechas tras la infección por *E. coli* (E). También se investigó si la pérdida de la formación de uniones estrechas se debía a la apoptosis. Para determinarlo, se evaluó mediante citometría de flujo la exposición de la anexina V en la superficie celular, una marca distintiva de las células apoptóticas. Las células endoteliales no infectadas tienen un bajo nivel de apoptosis, sin embargo, tras la adición de *E. coli* a las células endoteliales, la apoptosis aumentó significativamente. La adición de *E. coli* $\Delta ompA$ provocó un grado de apoptosis significativamente menor en las células endoteliales (F). La adición de la cepa *ompA* complementada también indujo una apoptosis comparable a la del control de *E. coli*. La preincubación de las células endoteliales con cilengitida condujo a una reducción significativa de la apoptosis inducida por *E. coli*. La adición de cilengitida sola a las células endoteliales no afectó a la viabilidad de las células. Estos datos demuestran que la unión de *E. coli* a las células endoteliales sometidas a cizalladura da lugar a la separación de las células endoteliales, lo que provoca un aumento de la permeabilidad, y que la unión de *ompA* a $\alpha V\beta 3$ genera una señal que provoca la muerte celular programada (apoptosis).

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

" $\alpha V\beta 3$ " es un miembro de la familia de supergenes de integrinas de receptores de glicoproteínas de la superficie celular que promueven la adhesión celular. Se une a una variedad de proteínas plasmáticas y de la matriz extracelular que contienen la secuencia de aminoácidos conservada RGD y modula la adhesión celular. Se expresa altamente en osteoclastos, donde desempeña un papel en la resorción ósea, y también es abundante en las células musculares lisas vasculares y en las células endoteliales, así como en algunas células tumorales, donde participa en la angiogénesis y la migración celular (Felding *et al.*, Curr Opin Cell Biol. 1993;5:864-868).

" $\alpha V\beta 3$ endotelial vascular" se refiere a la integrina $\alpha V\beta 3$ expresada por las células endoteliales vasculares.

"Dominio αV " se refiere al dominio αV de la integrina $\alpha V\beta 3$ endotelial vascular. La secuencia del dominio αV del endotelio vascular humano se proporciona en SEQ ID NO: 1:

ITAV_Integrina alfa-V HUMANA OS=Homo sapiens (SEQ ID NO: 1)

MAFPFRRRLRLGPRGLPLLLSGLLLPLCRAFNLDVDSPA EYSGPEGSYFGFAVDFFVP
 SASSRMFLLVGAPKANTTQPGIVEGGQVLKCDWSSTRRCQPIEFDATGNRDYAKDD
 PLEFKSHQWFGASVRSKQDKILACAPLYHWRTEMKQEREPVGTCTFLQDGTKTVEYA
 PCRSQDIDADGQGFCQGGFSIDFTKADRVLLGGPGSFYWQGGQLISDQVAEIVSKYDP
 NVYSIKYNNQLATRTAQAIFFDDSYLGYSVAVGDFNGDGIDDFVSGVPRAARTLGMV
 YIYDGKNMSSLYNFTGEQMAAYFGFSVAATDINGDDYADVFIGAPLFMDRGSDGKL
 QEVGQVSVSLQRASGDFQTTKLNGFEVFAFSGSAIAPLGDLQDGFNDIAIAAPYGG
 EDKKGIVYIFNGRSTGLNAVPSQILEGQWAARSMPPSFGYSMKGATDIDKNGYPDLI
 VGAFGVDRAILYRARPVITVNAGLEVYPSILNQDNKTCSLPGTALKVSCFNVRFLK
 ADGKGVLPRKLNQVELLLDKLKQKGAIIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGGMLMQCEE
 LIAYLRDESEFRDKLTPITIFMEYRLDYRTAADTTGLQPILNQFTPANISRQAHILLDC
 GEDNVCKPKLEVSVSDSQKKIYIGDDNPLTLIVKAQNQGE GAYEAEIVSIPLQADFI
 GVVRNNEALARLSCAFKTENQTRQVVC DLGNPMKAGTQLLAGLRF SVHQQSEMDT
 SVKFDLQIQSSNLFDKVSPVVSHKVDLAVLAAVEIRGVSSPDHVFLPIPNWEHKENPE
 TEEDVGPVVQHIYELRNNGPSSFSKAMLHLQWPYKYNNNTLLYILHYDIDGPMNCT
 SDMEINPLRIKISSLQTTEKNDTVAGQGERDHLITKRDLALSEGDIHTLGC GVAQCLKI
 VCQVGR LDRGKSAILYVKSLLTETFMNKENQNHSYSLKSSASFNVIEFPYKNLPIE
 DITNSTLVTTNVTWGIQPAPMPVPVWVILAVLAGLLLLAVLVFVMYRMGFFKRVRP
 PQEEQEREQLQPHENGEGNSET

“Dominio $\beta 3$ ” se refiere al dominio $\beta 3$ de la integrina $\alpha V\beta 3$ endotelial vascular. La secuencia del dominio $\beta 3$ del endotelio vascular humano se proporciona en SEQ ID NO: 2:

5

ITB3_Integrina beta-3 HUMANA OS=Homo sapiens (SEQ ID NO: 2)

MRARPRPRPLWATVLALGALAGVGVGGNICTTRGVSSCQQLAVSPMCAWCSDE
 ALPLGSPRCDLKENLLKDNCAPE SIEFPVSEARVLEDRPLSDKGSGDSSQVTQVSPQRI
 ALRLRPDDSKNFSIQVRQVEDYPVDIYYLMDLSYSMKDDLWSIQNLGTKLATQMRK
 LTSNLRIGFGAFVDKPVSPYMYISPPEALENPCYDMKTTCLPMFGYKHVLTLDQVT
 RFNEEVKKQSVSRNRDAPEGGFDAIMQATVCDEKIGWRNDASHLLVFTTDAKTHIA
 LDGRLAGIVQPNDGQCHVGSDNHYSASTTMDYPSLGLMTEKLSQKNINLIFAVTENV
 VNLYQNYSELIPGTTVGVL SMDSSNVLQLIVDAYGKIRSKVELEVRLPEELSLSFNA
 TCLNNEVIPGLKSCMGLKIGDTV SFSIEAKVRGCPQEKEKSFTIKPVGFKDSLIVQVTF
 DCDCACQAQAEPNSHRCNNGNGTFECGVCRCGPWLGSQCECSEEDYRPSQQDECS
 PREGQPVC SQRGECLCGQCVC HSSDFGKITGKYCECDDFSCVRYKGEMCSGHGQCS
 CGDCLCDSDWTGYCNCCTTRTDTCMSSNGLLCSGRGKCECGSCVCIQPGSYGDTCE
 KCPTCPDACTFKKECVECKKFDRGALHDENTCNRYCRDEIESVKELKDTGKDAVNC
 TYKNEDDCVVRFQYYEDSSGKSILYVVEEPEC PKGPDILVVLLSVMGAILLIGLAALL

10

IWKLLITIHDRKEFAKFEERARAKWDTANNPLYKEATSTFTNITYRGT

“Antagonista de $\alpha V\beta 3$ ” se refiere a una molécula que puede unirse a una integrina $\alpha V\beta 3$. Los ejemplos incluyen péptidos {cíclicos y no cíclicos}, ligandos no peptídicos, desintegradores, peptidomiméticos, anticuerpos e inhibidores de genes. Un ejemplo de un péptido cíclico es la cilengitida. En la bibliografía se describen ejemplos

de antagonistas de anticuerpos, por ejemplo, el documento US5652110. También se describen antagonistas de $\alpha V\beta 3$ en Millard *et al.* (Theranostics 2011; 1:154=188), Kim *et al.* (Mol Pharm, 7 de octubre de 2013, 3603-3611), Pfaff *et al.* (J Biol Chem 1994; 269, 20233-20238), Healy *et al.* (Biochemistry 1995; 34, 3948-3955), documento EP2298308 (University of Southern California), Koivunen *et al.* (J Biol Chem 1993;268; 20205-20210 y 1994;124:373-380), Ruoslahti *et al.* (Annu Rev Cell Dev Biol. 1996; 12:697-715), y Ponce *et al.* (Faseb J. 2001; 15; 1389-1397). En una realización, el antagonista de $\alpha V\beta 3$ es selectivo para las integrinas αV .

“Antagonista funcional de $\alpha V\beta 3$ ” se refiere a un antagonista de $\alpha V\beta 3$ que puede unirse a la integrina $\alpha V\beta 3$ endotelial vascular y provocar una disminución de la unión de las bacterias *S. aureus* y/o *E. coli* a la integrina $\alpha V\beta 3$ endotelial vascular en el ensayo de unión *in vitro* descrito a continuación. Los ejemplos incluyen la cilengitida y sus variantes descritas en el documento EP0770622. Someter a prueba los antagonistas de $\alpha V\beta 3$ descritos en la bibliografía usando el ensayo de adhesión *in vitro* descrito a continuación para identificar antagonistas funcionales de $\alpha V\beta 3$ constituye una rutina para un experto en la técnica.

La “cilengitida” es un potente inhibidor de la integrina para el receptor $\alpha V\beta 3$. Se trata de un pentapéptido cíclico (ciclo(-RGDf(NMe)V-) que es selectivo para las integrinas αV (Jonczyk *et al.*, solicitud de patente europea n.º: 0770622). La síntesis y la actividad de la molécula se publicaron en 1999 (Dechantsreiter *et al.*, J Med Chem, 12 de agosto de 1999; 42(16)). La cilengitida se ha indicado para el tratamiento del cáncer (documentos EP2578225, EP2338518, EP2441464).

“Variante funcional de cilengitida” significa las variantes de cilengitida descritas en el documento US6001961 que son inhibidores de integrina para el receptor $\alpha V\beta 3$, específicamente los péptidos cíclicos descritos en las SEQ ID NO 1 a 40 (documento US6001961, columnas 12-13).

“Antagonista de bajo peso molecular” significa un antagonista que tiene un peso molecular de menos de 50 kDa. En una realización, el antagonista de bajo peso molecular tiene un peso molecular de menos de 20 kDa. En una realización, el antagonista de bajo peso molecular tiene un peso molecular de menos de 10 kDa. En una realización, el antagonista de bajo peso molecular tiene un peso molecular de menos de 5 kDa. En una realización, el antagonista de bajo peso molecular tiene un peso molecular de menos de 4 kDa. En una realización, el antagonista de bajo peso molecular tiene un peso molecular de menos de 3 kDa. En una realización, el antagonista de bajo peso molecular tiene un peso molecular de menos de 2 kDa. En una realización, el antagonista de bajo peso molecular tiene un peso molecular de menos de 1 kDa.

“Anticuerpo contra $\alpha V\beta 3$ ” significa un anticuerpo que se une a la integrina $\alpha V\beta 3$. En una realización, el anticuerpo se une específicamente a la integrina $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$. En una realización, el anticuerpo se une específicamente a la integrina $\alpha V\beta 3$. En la bibliografía se describen ejemplos de anticuerpos contra $\alpha V\beta 3$ (Liu *et al.*, Drug Dev Res 2008; 69(6) 329-339) y están disponibles comercialmente, por ejemplo: MAB1976, un anticuerpo monoclonal de ratón disponible comercialmente de MerckMillipore (clon LM609), también conocido como AVASTIN; Vitaxin I, un anticuerpo monoclonal humanizado (Coleman *et al.*, Circulation Research 1999; 84; 1268-1276); ABEGRIIN, un derivado de Vitaxin I fabricado por Medimmune; CNTO95, un anticuerpo totalmente humanizado que reconoce múltiples integrinas αV y se une a las integrinas $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$ con gran afinidad (Trika *et al.* Int J Cancer 2004;110; 326-335); c7E3 Fab (ABCIXIMAB o REOPRO) y c7E3(Fab')₂, fragmentos de AcM murino y quimérico ratón-humano del AcM murino intacto original 7E3 (Trika *et al.* Cancer Res 2002; 62;2824-2833 y Varner *et al.* Angiogenesis 1999; 3;53-60); el anticuerpo 17E6 (Mitjans *et al.* J Cell Sci 1995; 108; 2825-2838; el término “anticuerpo contra $\alpha V\beta 3$ ” incluye anticuerpos que se unen selectivamente al dominio αV , al dominio $\beta 3$, o a ambos dominios αV y $\beta 3$. El término “anticuerpo contra $\alpha V\beta 3$ funcional” significa un anticuerpo contra $\alpha V\beta 3$ que se une a la integrina $\alpha V\beta 3$ endotelial vascular y puede bloquear, al menos parcialmente, la adhesión de las bacterias *S. aureus* o *E. coli* a las células endoteliales en el ensayo de adhesión *in vitro* descrito a continuación.

“Desintegrina” significa la familia de péptidos de bajo peso molecular que contienen RGD y son ricos en cisteína, derivados de venenos de víbora, que pueden unirse a $\alpha V\beta 3$ y bloquear su función. Los ejemplos incluyen trigramina, kistrina, bitistatina, barbourina, equistatina, contortostatina, todos descritas o nombradas en Liu *et al.* Drug Dev Res 2008; 69(6) 329-339.

“Peptidomiméticos” significa compuestos que contienen elementos estructurales no peptídicos que pueden imitar las acciones biológicas de los antagonistas de $\alpha V\beta 3$ peptídicos. Los ejemplos incluyen SC-68448 y SCH221153, ambos descritos o nombrados en Liu *et al.* Drug Dev Res 2008; 69(6) 329-339, e IS201 descrito en Bello *et al.* (Neurosurgery 2003;52; 177186).

“Inhibidores de genes” significa un ácido nucleico que puede provocar una expresión reducida de $\alpha V\beta 3$. En algunas realizaciones, el agente es un ácido nucleico. Un agente de ácido nucleico puede seleccionarse, por ejemplo, de ARNip, ARNh_c, miARN, anti-microARN, ARN u oligonucleótido antisentido, aptámero, ribozima, y cualquier combinación de los mismos. Cuando el agente es un ácido nucleico, puede administrarse al sujeto el propio agente o puede administrarse al sujeto un vector que exprese/codifique para el agente. En algunas

realizaciones, el vector que expresa/codifica para el agente es un vector de virus adenoasociado (AAV).

“Infección de la sangre” o “infección sanguínea” significa una infección microbiana de la sangre, por ejemplo, una infección de la sangre bacteriana, vírica o por hongos. En una realización, el término significa infección bacteriana de la sangre. Un paciente con una infección bacteriana de la sangre suele denominarse “bacteriémico”. En una realización, el término significa infección bacteriana de la sangre donde la bacteria es una bacteria que provoca septicemia. En una realización, el término significa infección bacteriana de la sangre con un género bacteriano seleccionado de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*. En una realización, el término significa infección bacteriana de la sangre con una especie bacteriana seleccionada de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.* Los agentes causantes de la septicemia bacteriana se describen con más detalle en Ramachandran *et al.* (Virulence, 1 de enero de 2014; 5(1); 213-218).

La septicemia se diagnostica cuando un paciente presenta al menos dos de los siguientes síntomas, además de una infección probable o confirmada:

- Temperatura corporal por encima de 101°F (38,3°C) o por debajo de 96,8°F (36°)
- Ritmo cardíaco superior a 90 pulsaciones por minuto
- Frecuencia respiratoria superior a 20 respiraciones por minuto

La septicemia grave se diagnostica si el paciente también presenta al menos uno de los siguientes signos y síntomas, que indican que un órgano puede estar fallando:

- Disminución significativa de la diuresis
- Cambio brusco del estado mental
- Disminución del recuento de plaquetas (trombocitopenia)
- Dificultad para respirar
- Función de bombeo del corazón anómala
- Dolor abdominal

El choque séptico se diagnostica si, además de los síntomas de septicemia grave, el paciente también presenta una presión arterial extremadamente baja que no responde adecuadamente a la simple rehidratación.

En esta memoria descriptiva, el término “tratar” se refiere a la administración de un antagonista de $\alpha V\beta 3$, cilengtida, a un individuo que tiene o se sospecha que tiene una infección de la sangre con el propósito de curar, sanar, prevenir, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar o inhibir el desarrollo de septicemia, incluyendo la septicemia grave o el choque séptico. En una realización preferida, el término significa prevenir o inhibir el desarrollo de septicemia en un individuo con una infección de la sangre. En una realización, se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista de $\alpha V\beta 3$. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad del antagonista de $\alpha V\beta 3$ que se requiere para conferir el efecto terapéutico previsto en el individuo, cantidad que variará dependiendo del tipo de antagonista, la vía de administración, el estado de la infección o la septicemia, y la posible inclusión de otros productos terapéuticos o excipientes. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de menos de 100 mg/m². “mg/m²” significa mg por m² de superficie corporal, y en www.halls.md/body-surface-area/bsa.htm se proporciona un método para calcular la superficie corporal. En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de menos de 50 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de menos de 10 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de menos de 5 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de menos de 1 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,001 a 50 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,001 a 10 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,001 a 1,0 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,01 a 10 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,1 a 10 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,001 a 1,0 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,01 a 1 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es de 0,1 a 1 mg/m². En una realización, la cantidad terapéuticamente eficaz se administra una vez al día durante un periodo de 2 a 14 días. En una realización, los métodos y usos de la invención se aplican especialmente a pacientes que tienen o se sospecha que tienen una infección bacteriana de la sangre y con el propósito de inhibir o prevenir el desarrollo de septicemia. En otra realización, los métodos y usos de la invención se aplican a

pacientes que están en riesgo de infección bacteriana de la sangre (es decir, pacientes inmunocomprometidos, pacientes con traumatismos y pacientes que se han sometido a una cirugía mayor, tal como cirugía cardiorrónica) y con el propósito de prevenir o inhibir la infección bacteriana de la sangre. En una realización, los métodos y usos de la invención se aplican especialmente a pacientes que tienen o se sospecha que tienen septicemia y con el propósito de inhibir o prevenir el desarrollo de septicemia grave o choque séptico. En una realización, el método y los usos de la invención son para un paciente que lo necesita. El término "paciente que lo necesita" se refiere a una persona que tiene o se sospecha que tiene o desarrolla septicemia. El término "prevención de septicemia" significa la prevención o inhibición del desarrollo de septicemia en un paciente con una infección sanguínea, o a la prevención o inhibición del desarrollo de septicemia grave en un paciente con septicemia, o a la prevención o inhibición del desarrollo del choque séptico en un paciente con septicemia grave.

Para llevar a práctica el uso de esta invención, la cilengitida se administra por vía intravenosa. El término "parenteral", tal como se usa en el presente documento, incluye las técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralumbal o intracranial. Una composición inyectable estéril, por ejemplo, una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril, puede formularse según técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados (tales como Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están manitol, agua, solución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, monoglicéridos o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas disoluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, o carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. Otros tensioactivos de uso común, tales como Tween o Span u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares que se usan habitualmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas o de otro tipo farmacéuticamente aceptables, también pueden usarse para la formulación.

Una composición para la administración oral puede ser cualquier forma farmacéutica oralmente aceptable, incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y disoluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para su uso oral, los portadores que se usan comúnmente incluyen la lactosa y el almidón de maíz. También se añaden normalmente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se administran por vía oral suspensiones o emulsiones acuosas, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se desea, pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes. Un aerosol nasal o una composición para inhalación puede prepararse según técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica. Una composición que contiene compuestos multicíclicos fusionados también puede administrarse en forma de supositorios para administración rectal. El portador en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el principio activo de la formulación (y preferiblemente, que pueda estabilizarlo) y no perjudicial para el sujeto que a tratarse. Por ejemplo, uno o más agentes solubilizantes, que forman complejos más solubles con los compuestos multicíclicos fusionados, o más agentes solubilizantes, pueden usarse como portadores farmacéuticos para la administración de los compuestos activos. Los ejemplos de otros portadores incluyen dióxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y amarillo D&C n.º 10.

"Anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina intacta de unión a $\alpha V\beta 3$ en cualquier forma incluyendo, pero no limitan a, la forma monoclonal, policlonal, humanizada o humana, o fragmentos de anticuerpos que se unen a $\alpha V\beta 3$. El término incluye fragmentos monoclonales o policlonales de unión a $\alpha V\beta 3$ con la región Fc (fragmento cristizable) o el fragmento de unión a FcRn de la región Fc, denominado en el presente documento "fragmento Fc" o "dominio Fc". En una realización, el anticuerpo tiene la región Fc eliminada o modificada de manera que no puede interactuar con la proteína A de las bacterias. Los métodos de fabricación de tales anticuerpos se describen en Hay *et al.* (Immunochimistry 12(5):373-378), Parkham *et al.* (J. Immunol 1983:131(6):2895-2902) y Baldwin *et al.* (J. Immunol Methods 1989 121(2): 209-217). Los fragmentos de unión a $\alpha V\beta 3$ pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión a $\alpha V\beta 3$ incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAc y de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio único, anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir una unión de antígeno específica al polipéptido. El dominio Fc incluye porciones de dos cadenas pesadas que contribuyen a dos o tres clases del anticuerpo. El dominio Fc puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática (por ejemplo, escisión con papaína) o a través de escisión química de anticuerpos intactos.

El anticuerpo puede ser una molécula IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. En una realización preferida, la molécula de

anticuerpo es una IgG, y más preferiblemente es del subtipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La clase y subclase de anticuerpos pueden determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, usando anticuerpos que sean específicos para una clase y subclase particular de anticuerpos. Los anticuerpos específicos para $\alpha\text{V}\beta 3$ están disponibles comercialmente y se describen anteriormente. La clase y subclase pueden determinarse mediante ELISA e inmunotransferencias de tipo Western, así como mediante otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase pueden determinarse secuenciando todos o una parte de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y subclase de los anticuerpos.

Los anticuerpos son una clase principal de productos biofarmacéuticos. Los anticuerpos con fines terapéuticos se producen a menudo a partir de una línea celular (por ejemplo, células CHO, la línea de hámster BHK21, la línea celular humana PER.C6, COS, NIH 3T3, BHK, HEK, 293, L929, MEL, JEG-3, células linfoides murinas (incluyendo NS0 y Sp2/0-Ag 14)), incluyendo hibridomas, y son habitualmente un único clon de un anticuerpo específico. Los anticuerpos usados con fines terapéuticos se clasifican como anticuerpos murinos, quiméricos, humanizados o totalmente humanos y se producen mediante métodos recombinantes. Un "anticuerpo murino" es un anticuerpo totalmente de ratón y sólo tiene un uso limitado en humanos debido a su corta semivida en circulación y a su alta inmunogenicidad. Un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo modificado por ingeniería genética que contiene secuencias de ratón y humanas. La razón es de aproximadamente el 33% de contribución de ratón y el 67% de contribución humana. Habitualmente, los dominios variables son murinos y la región constante que incluye el fragmento Fc se deriva de una IgG humana.

Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo modificado por ingeniería genética, en el que el contenido de ratón se reduce hasta aproximadamente el 5-10%. En tales casos, las seis CDR de las cadenas pesada y ligera y un número limitado de aminoácidos estructurales del anticuerpo monoclonal murino se injertan mediante tecnología recombinante en el andamiaje de la IgG humana con agotamiento de CDR. Un anticuerpo totalmente humano o anticuerpo humano describe los anticuerpos que se elaboran en ratones humanizados, lo que da como resultado anticuerpos que no contienen ninguna secuencia de ratón, o que se elaboran *in vitro* usando bibliotecas de fagos o presentación en ribosomas, o que se obtienen alternativamente de donantes humanos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos quiméricos, humanizados o primados (injertados con CDR), que comprenden porciones derivadas de diferentes especies o anticuerpos totalmente humanos, también se engloban en la presente invención. Las diversas porciones de estos anticuerpos pueden unirse entre sí químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican para una cadena quimérica o humanizada pueden expresarse para producir una proteína contigua. Véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, patente europea n.º 0.125.023; Boss *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.397; Boss *et al.*, patente europea n.º 0.120.694; Neuberger, M. S. *et al.*, documento WO 86/01533; Neuberger, M. S. *et al.*, patente europea n.º 0.194.276 B1; Winter, patente estadounidense n.º 5.225.539; y Winter, patente europea n.º 0.239.400 B1. Véase también, Newman, R. *et al.*, BioTechnology, 10: 1455-1460 (1992), en relación con el anticuerpo primado. Véase, por ejemplo, Ladner *et al.*, patente estadounidense n.º 4.946.778; y Bird, R. E. *et al.*, Science, 242: 423-426 (1988)), en relación con los anticuerpos de cadena sencilla.

Además, puede usarse una mezcla de anticuerpos, denominada en el presente documento "preparación de anticuerpos", según los métodos de la presente invención. Tales preparaciones de anticuerpos incluyen mezclas de anticuerpos policlonales y monoclonales. Un anticuerpo humanizado puede comprender porciones de inmunoglobulinas de diferente origen. Por ejemplo, al menos una porción puede ser de origen humano. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender porciones derivadas de una inmunoglobulina de origen no humano con la especificidad requerida, tal como de ratón, y de secuencias de inmunoglobulina de origen humano (por ejemplo, una inmunoglobulina quimérica), unidas entre sí químicamente por técnicas (por ejemplo, de síntesis) convencionales o preparadas como un polipéptido contiguo mediante técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, el ADN que codifica para las porciones proteicas del anticuerpo quimérico puede expresarse para producir una cadena polipeptídica contigua). Alternativamente, puede crearse un anticuerpo humanizado en un animal transgénico o humanizado que exprese los genes del anticuerpo humano (véase Lonberg, N. "Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies". Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994): 49-101). Otro ejemplo de anticuerpo humanizado de la presente invención es una inmunoglobulina que contiene una o más cadenas de inmunoglobulina que comprenden una CDR de origen no humano (por ejemplo, una o más CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano) y una región de entramado derivada de una cadena ligera y/o pesada de origen humano (por ejemplo, anticuerpos injertados con CDR con o sin cambios de región de entramado). Los anticuerpos de cadena única quiméricos o injertados con CDR también se engloban en el término "anticuerpo humanizado".

Los métodos de preparación de inmunoglobulinas, la inmunización con antígenos y la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales pueden realizarse tal como se describe en el presente documento o mediante otras técnicas adecuadas. Se ha descrito una variedad de métodos. Véase, por ejemplo, Kohler *et al.*, Nature, 256: 495-497 (1975) y Eur. J. Immunol. 6: 511-519 (1976); Milstein *et al.*, Nature 266: 550-552 (1977); Koprowski *et al.*, patente estadounidense n.º 4.172.124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold

Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y.); Current Protocols In Molecular Biology, vol. 2 (suplemento 27, verano 1994), Ausubel, F. M. *et al.*, Eds., (John Wiley & Sons: Nueva York, N.Y.), capítulo 11, (1991; Rasmussen SK, Rasmussen LK, Weilguny D, Tolstrup AB. Biotechnol Lett. 20 de febrero de 2007). Los anticuerpos policlonales que pueden usarse en los métodos de la invención son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados (usando proteínas recombinantes o péptidos específicos de $\alpha V\beta 3$ como inmunógeno). Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra $\alpha V\beta 3$, puede producirse un hibridoma fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como SP2/0) con células productoras de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos, preferiblemente las del bazo o los ganglios linfáticos, se obtienen de animales inmunizados con el antígeno de interés (proteína recombinante o péptido específico de $\alpha V\beta 3$). Los hibridomas pueden aislarse usando condiciones de cultivo selectivas, y clonarse por dilución limitativa. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden seleccionarse mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA). Los anticuerpos pueden purificarse a partir del plasma de donantes humanos. Este es el enfoque actual para IVIg, en el que las inmunoglobulinas se aíslan del plasma normal de un gran número de donantes (véase <http://www.fda.gov/cber/gdlns/igivimmuno.htm> y Haeney Clin Exp Immunol. Julio de 1994; 97(suplemento 1): 11-15). Pueden usarse otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, por ejemplo, métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes de una biblioteca, o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Lonberg *et al.*, patente estadounidense n.º 5.545.806; Surani *et al.*, patente estadounidense n.º 5.545.807.

Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina que se produce de manera natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes. La capacidad de un anticuerpo individual para internalizarse, liberar una carga útil y destruir una célula diana puede variar enormemente dependiendo de la afinidad y del epítipo diana concreto al que se adhiera el anticuerpo. Para una diana determinada, en este caso IL1RAPL-1, debe desarrollarse un panel de anticuerpos (que cubrirá un rango de afinidades de unión y epítopos) para la conjugación de ADC. El término "anticuerpo humano" incluye todos los anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. En una realización, todos los dominios variables y constantes se derivan de secuencias de inmunoglobulina humana (un anticuerpo totalmente humano). El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más de otros anticuerpos diferentes. En una realización, una o más de las CDR se derivan de un anticuerpo humano específico. En una realización más preferida, todas las CDR se derivan de un anticuerpo humano. En otra realización preferida, las CDR de más de un anticuerpo humano se mezclan y combinan en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo humano en combinación con CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo humano, y las CDR de la cadena pesada pueden derivarse de un tercer anticuerpo. Además, las regiones de entramado pueden derivarse de uno de los mismos anticuerpos, de uno o más anticuerpos diferentes, tales como un anticuerpo humano, o de un anticuerpo humanizado. (Quimérico no se enumera en la página 4, véanse anticuerpos y fragmentos específicos para la proteína diana).

Sección experimental

Condiciones de cultivo celular

Se adquirieron células endoteliales de la aorta humana derivadas principalmente de Promocell GmbH (Heidelberg, Alemania). Se hicieron crecer las células de manera rutinaria en frascos de cultivo tisular Cell+ T75 que contenían medio de crecimiento de células endoteliales Promocell MV suplementado con suero de ternera fetal al 5%, suplemento de crecimiento de células endoteliales/extracto hipotalámico bovino al 0,4%, heparina (90 mg/ml), hidrocortisona (1 mg/ml), factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 mg/ml). Se hicieron crecer las células en una atmósfera humidificada del 5% de CO₂/el 95% de aire a 37°C. Para todos los experimentos se usaron células entre los pases 6 y 12. Las HAoEC se sembraron a $0,4 \times 10^6$ en placas de 6 pocillos y se hicieron crecer hasta alcanzar la confluencia. Las HAoEC se sometieron a cizalladura aplicando 10 dyn/cm² de tensión de cizalladura durante 24 horas. Después de la cizalladura, las células o bien se sometieron a experimentos en la placa de 6 pocillos o bien se recogieron para sembrarlas en ensayos de adhesión, proliferación y permeabilidad.

Condiciones de cultivos bacterianos

Se hicieron crecer cultivos bacterianos de *S. aureus* y *E. coli* hasta la fase estacionaria a 37°C en caldo de infusión de cerebro corazón. Se hizo crecer *L. lactis* hasta la fase estacionaria a 37°C en agar M17 complementado con glucosa hasta una concentración final del 0,5%. Se hicieron crecer cepas mutantes *L. lactis* +CifA en presencia de eritromicina hasta una concentración final de 5 ug/ml y se hizo crecer *L. lactis* +CifA PY en

presencia de cloranfenicol hasta una concentración final de 10 ug/ml. Se recogieron las bacterias y se lavaron mediante centrifugación a 2600 × g durante 7 minutos y resuspendiéndolas en PBS de pH 7,4 y ajustándolas a DO1 a 600 nm. Para los experimentos que utilizan tinción fluorescente, se usó una solución salina tamponada con Tris (TBS) pH 7,4 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) en lugar de PBS para evitar cualquier incompatibilidad con los grupos fosfato del tampón.

Inmunohistoquímica

Se adhirieron cubreobjetos de vidrio (tipo 1, 24 × 24 mm y vidrio de borosilicato de 0,17 mm de grosor) a la base de un cultivo tisular de 6 pocillos sellando los bordes inferiores con un rotulador PAP. Se sembraron HAOEC en el pocillo a 600.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas para asegurar su adhesión a los cubreobjetos de vidrio. Se reemplazó el medio en el pocillo y se expusieron las células a una fuerza de cizalladura de 10 dyn/cm² durante 24 horas. Después de la cizalladura, se retiró el medio, se retiró el cubreobjetos del pocillo y se lavaron las células con PBS a 37°C. Se fijaron las células con formaldehído al 3,7% en PBS durante 20 minutos en hielo, se lavaron y se permeabilizaron con Triton 100X al 0,2% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el líquido y se lavaron las células con 2 ml de PBS tres veces. Se bloquearon las células con 1,5 ml por pocillo de BSA al 5% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS. Se añadió anticuerpo monoclonal anti ZO-1 a las células a una dilución 1:100 en 400 µl de BSA al 5% y se incubó durante la noche a 4°C. Después se lavaron las células y se añadió anticuerpo secundario de conejo anti-IgG de cabra conjugado con Alexafluor 488 a una concentración de 1:1000 en 1 ml de BSA incubando en las células durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la tinción con el anticuerpo secundario, las células se lavaron tres veces en 1 ml de PBS. Se añadió una gota de ProLong® Diamond Antifade Mountant con DAPI a un portaobjetos de vidrio y se montó en él el cubreobjetos con las células. Se adquirieron imágenes usando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss AxioObserverZ1) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63x/1,40 (Ex/Em 488nm/>505nm para ZO-1 y 350/> 400nm para DAPI). Se prepararon células estáticas para compararlas con las sometidas a cizalladura de la misma manera pero omitiendo la etapa de cizalladura durante la noche.

Ensayo de unión

Se sembraron HAOEC sometidas a cizalladura en pocillos de una placa de cultivo tisular de 96 pocillos a una densidad de 2,5×10⁴ células por pocillo en un volumen de 100 µl. Se llevaron a cabo experimentos o bien en presencia o bien ausencia de TNFα a 10 ng/ml. Se incubaron las HAOEC a 37°C y el 5% de CO₂ durante 4 horas para facilitar la adhesión y el contacto célula-célula en la placa. Tras las 4 horas de incubación, se retiró el medio y se añadieron 100 µl de plasma pobre en plaquetas humanas (PPP), fibrinógeno 4 mg/ml o IgG 1 mg/ml a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a 37°C y el 5% de CO₂. Se lavaron los pocillos con PBS y se bloquearon los pocillos con 100 µl de prepocillo al 1% durante 1 hora a 37°C. Por último, se lavaron los pocillos con 100 µl de TBS y se añadieron 100 µl de bacterias teñidas con SYBR green II por pocillo a una MOI de 400. Se incubaron las células durante 1 hora adicional a 37°C y el 5% de CO₂ y luego se leyeron en un lector de placas fluorescentes (1420 Victor V3, Perkin Elmer, Dublín, Irlanda) a 485/535 nm. Luego se retiraron las bacterias suavemente con una pipeta y se lavó la placa con 100 µl de TBS/pocillo. Se leyó de nuevo la placa a 485/535 nm. Se calcularon las bacterias adheridas como un porcentaje restante de la lectura inicial multiplicado por el número de bacterias añadidas. El agotamiento del plasma se llevó a cabo volviendo a suspender un sedimento de 1 ml de DO1 de *L. lactis* +ClfA en 1 ml de plasma humano hirudinizado. Esto se dejó en un rotador a 37°C durante 1 h, se centrifugó a 3200 × g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El plasma ahora deficiente en las proteínas plasmáticas unidas por ClfA se usó en el ensayo de adhesión bacteriana. El bloqueo de las células endoteliales con c(RGDfV) se llevó a cabo mediante una etapa adicional después de la incubación de 4 horas con TNFα y antes de la adición de fibrinógeno. Al retirar el medio que contenía TNFα, se añadieron 100µl de un nuevo medio que contenía C(RGDfV) 0,05 µM a las células endoteliales y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Este experimento se repitió usando *E. coli*.

Transferencia puntual

Crecimientos durante la noche de *S. aureus* de tipo natural Newman Wild, mutantes, *L. lactis* transfectada de manera simulada y cepas mutantes ajustadas a DO1 a 600 nm en PBS y lisadas usando tampón RIPA. Se colocó una mancha del lisado en una membrana de nitrocelulosa que se dejó secar a temperatura ambiente. Se bloqueó la membrana con proteínas de leche desnatada al 5% p/v. Se sondaron las membranas con anticuerpos anti-ClfA o anti-SpA seguido de anticuerpos secundarios conjugados con HRP. Se detectó el anticuerpo secundario mediante la adición de una disolución de quimioluminiscencia potenciada a la membrana durante 5 minutos antes de transferir la membrana a un casete radiográfico y exponer la película de rayos X a las membranas en una sala oscura.

Citometría de flujo

Se expusieron las HAOEC sometidas a cizalladura en una placa de 6 pocillos a 1 ng de TNFα por cada 25.000

células endoteliales o medios recién preparados y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Se retiró el medio que contenía TNF α y se añadió 1 ml de Fg 4mg/ml en el medio a 37°C durante 1 hora. Se separaron las células por tripsinización y se sedimentaron. Se lavó el sedimento celular en PBS helado (4°C) antes de sondarse con el anticuerpo anti- α V β 3 LM609 durante 15 minutos, se lavó y se sondó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón 535. Se analizaron las células en un citómetro de flujo (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II).

Ensayo de proliferación

Se sembraron HAoEC sometidas a cizalladura en una placa de seis pocillos a 150.000 células por pocillo en 1,6 ml de medio que contenía 10 ng/ml de TNF α . Se incubaron las células durante 4 horas a 37°C en el 5% de CO₂. Se reemplazó el medio por 1,6 ml de o bien medio recién preparado o bien de medio que contenía 0,05 μ M de cilengitida y se incubó durante 1 hora. Tras esto se retiró el medio y se añadió 1 ml de fibrinógeno 4 mg/ml por pocillo, incubándose durante una hora adicional. Se retiró el medio y se lavó el pocillo con medio libre de antibióticos. A cada pocillo se añadieron 1,6 ml de medio libre de antibióticos con *S. aureus* Newman o *S. aureus* Δ CIfA para una MOI de 400. Se incubaron las células a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación, se retiró el medio de las células y se lavaron 4 veces con PBS caliente. Se separaron las células de la placa de 6 pocillos por tripsinización y se contaron en un hemocitómetro.

Ensayo de apoptosis

Se expusieron HAoEC sometidas a cizalladura en una placa de 6 pocillos a 1 ng de TNF α por cada 25.000 células endoteliales y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Se retiró el medio que contenía TNF α y se colocó 1 ml de Fg 4 mg/ml en el medio a 37°C durante 1 hora. Se retiró el medio y se sustituyó por 1 ml de medio libre de antibióticos que contenía *S. aureus* Newman WT o Newman Δ CIfA hasta una MOI de 400 en un volumen final por pocillo de 2 ml. Se incubaron las células durante 24 horas a 37°C. Tras la incubación, se retiró el medio y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS caliente. Se separaron las células por tripsinización y se sedimentaron. Se lavó el sedimento celular en PBS frío (4°C) antes de teñirlo con un kit de apoptosis de anexina V TACS™. Se analizaron las células en un citómetro de flujo (citómetro de flujo BD FACSCanto™ II). Se repitió el experimento para someter a prueba el bloqueo de α V β 3 mediante cilengitida a 0,05 μ M durante 1 hora entre la exposición al TNF α y la adición de fibrinógeno 4 mg/ml durante 1 hora. Este experimento se repitió usando *E. coli* y *E. coli* Δ ompA en lugar de *S. aureus* Newman WT o Newman Δ CIfA.

Permeabilidad

Se evaluó la permeabilidad de la barrera endotelial usando un aparato Transwell con ligeras modificaciones. Se tripsinizaron HAoEC sometidas a cizalladura y se sembraron en insertos colgantes, se colocaron en una placa de 6 pocillos. En la cámara inferior (abluminal) de la placa se añadieron 4 ml de medio celular y en la cámara superior (luminal) se añadieron 2 ml de medio con 200.000 células/ml. Se incubaron las placas de pocillos a 37°C en una atmósfera humidificada y con el 5% de CO₂ durante la noche para formar una monocapa confluyente. El medio de la cámara abluminal se cambió a un medio libre de antibióticos y, simultáneamente, se retiró el medio de la cámara luminal y se lavó con un medio libre de antibióticos. Se infectaron las células con *S. aureus* Newman WT y *S. aureus* Δ CIfA en 2 ml de medio libre de antibióticos para infectar las células a una MOI de 400 durante 3 horas a 37°C. Se añadió dextrano FITC (40 kDa) a la cámara superior hasta una concentración final de 250 μ g/ml en 2 ml. Se tomaron muestras del medio de la cámara abluminal 24 horas después de la infección, que se midieron en un lector de placas a la fluorescencia Ex/Em 485/535 nm. El experimento se repitió para analizar el bloqueo de α V β 3 por cilengitida a 0,05 μ M durante 1 h entre la exposición al TNF α y la adición de fibrinógeno 4 mg/ml en lugar de plasma durante 1 h. Este experimento se repitió usando *E. coli* y *E. coli* Δ ompA en lugar de *S. aureus* Newman WT o Newman Δ CIfA.

Ensayo de citotoxicidad MTT

Se midió la actividad metabólica de las células utilizando un kit de ensayo MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Se sembraron HAoEC sometidas a cizalladura en una placa de microtitulación transparente de 96 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo en 100 μ l en un medio que contenía TNF α 10 ng/ml. Se incubaron las células durante 4 horas a 37°C. Se retiró el medio de los pocillos después de 4 horas y se reemplazó con 100 μ l de medio celular recién preparado, medio celular que contenía un vehículo o medio celular que contenía cilengitida 0,05 μ M. Se incubó la placa durante una hora adicional antes de cambiar el medio por 100 μ l de medio celular recién preparado con 10 μ l de caldo de MTT 12 mM y se incubó la placa a 37°C durante 4 horas. Se retiró todo el líquido de cada pocillo menos 25 μ l y se añadieron 10 μ l de DMSO por pocillo. Se incubó la placa durante 10 minutos a 37°C antes de leer en un lector de placas la absorbancia a 570 nm.

Lista de secuencias

- 5 <110> REAL COLEGIO DE CIRUJANOS DE IRLANDA
- <120> Método para tratar o prevenir septicemia
- <130> P11915PC00
- 10 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
<211> 1048
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
- 20 <400> 1
Met Ala Phe Pro Pro Arg Arg Arg Leu Arg Leu Gly Pro Arg Gly Leu
1 5 10 15
- Pro Leu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Leu Pro Leu Cys Arg Ala Phe Asn
20 25 30
- Leu Asp Val Asp Ser Pro Ala Glu Tyr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Tyr
35 40 45
- Phe Gly Phe Ala Val Asp Phe Phe Val Pro Ser Ala Ser Ser Arg Met
50 55 60
- Phe Leu Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asn Thr Thr Gln Pro Gly Ile
65 70 75 80
- Val Glu Gly Gly Gln Val Leu Lys Cys Asp Trp Ser Ser Thr Arg Arg
85 90 95
- Cys Gln Pro Ile Glu Phe Asp Ala Thr Gly Asn Arg Asp Tyr Ala Lys
100 105 110
- Asp Asp Pro Leu Glu Phe Lys Ser His Gln Trp Phe Gly Ala Ser Val
115 120 125
- Arg Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu Ala Cys Ala Pro Leu Tyr His Trp
130 135 140
- Arg Thr Glu Met Lys Gln Glu Arg Glu Pro Val Gly Thr Cys Phe Leu
145 150 155 160
- Gln Asp Gly Thr Lys Thr Val Glu Tyr Ala Pro Cys Arg Ser Gln Asp
165 170 175

ES 2 925 697 T3

Ile Asp Ala Asp Gly Gln Gly Phe Cys Gln Gly Gly Phe Ser Ile Asp
 180 185 190
 Phe Thr Lys Ala Asp Arg Val Leu Leu Gly Gly Pro Gly Ser Phe Tyr
 195 200 205
 Trp Gln Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys
 210 215 220
 Tyr Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Lys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr
 225 230 235 240
 Arg Thr Ala Gln Ala Ile Phe Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Val
 245 250 255
 Ala Val Gly Asp Phe Asn Gly Asp Gly Ile Asp Asp Phe Val Ser Gly
 260 265 270
 Val Pro Arg Ala Ala Arg Thr Leu Gly Met Val Tyr Ile Tyr Asp Gly
 275 280 285
 Lys Asn Met Ser Ser Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala
 290 295 300
 Tyr Phe Gly Phe Ser Val Ala Ala Thr Asp Ile Asn Gly Asp Asp Tyr
 305 310 315 320
 Ala Asp Val Phe Ile Gly Ala Pro Leu Phe Met Asp Arg Gly Ser Asp
 325 330 335
 Gly Lys Leu Gln Glu Val Gly Gln Val Ser Val Ser Leu Gln Arg Ala
 340 345 350
 Ser Gly Asp Phe Gln Thr Thr Lys Leu Asn Gly Phe Glu Val Phe Ala
 355 360 365
 Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp Gly
 370 375 380
 Phe Asn Asp Ile Ala Ile Ala Ala Pro Tyr Gly Gly Glu Asp Lys Lys
 385 390 395 400
 Gly Ile Val Tyr Ile Phe Asn Gly Arg Ser Thr Gly Leu Asn Ala Val
 405 410 415
 Pro Ser Gln Ile Leu Glu Gly Gln Trp Ala Ala Arg Ser Met Pro Pro
 420 425 430

ES 2 925 697 T3

Ser Phe Gly Tyr Ser Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Asp Lys Asn Gly
 435 440 445
 Tyr Pro Asp Leu Ile Val Gly Ala Phe Gly Val Asp Arg Ala Ile Leu
 450 455 460
 Tyr Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr
 465 470 475 480
 Pro Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly Thr
 485 490 495
 Ala Leu Lys Val Ser Cys Phe Asn Val Arg Phe Cys Leu Lys Ala Asp
 500 505 510
 Gly Lys Gly Val Leu Pro Arg Lys Leu Asn Phe Gln Val Glu Leu Leu
 515 520 525
 Leu Asp Lys Leu Lys Gln Lys Gly Ala Ile Arg Arg Ala Leu Phe Leu
 530 535 540
 Tyr Ser Arg Ser Pro Ser His Ser Lys Asn Met Thr Ile Ser Arg Gly
 545 550 555 560
 Gly Leu Met Gln Cys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Glu Ser
 565 570 575
 Glu Phe Arg Asp Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ile Phe Met Glu Tyr Arg
 580 585 590
 Leu Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Asp Thr Thr Gly Leu Gln Pro Ile Leu
 595 600 605
 Asn Gln Phe Thr Pro Ala Asn Ile Ser Arg Gln Ala His Ile Leu Leu
 610 615 620
 Asp Cys Gly Glu Asp Asn Val Cys Lys Pro Lys Leu Glu Val Ser Val
 625 630 635 640
 Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Asn Pro Leu Thr
 645 650 655
 Leu Ile Val Lys Ala Gln Asn Gln Gly Glu Gly Ala Tyr Glu Ala Glu
 660 665 670
 Leu Ile Val Ser Ile Pro Leu Gln Ala Asp Phe Ile Gly Val Val Arg
 675 680 685

ES 2 925 697 T3

Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser Cys Ala Phe Lys Thr Glu Asn
 690 695 700
 Gln Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met Lys Ala Gly
 705 710 715 720
 Thr Gln Leu Leu Ala Gly Leu Arg Phe Ser Val His Gln Gln Ser Glu
 725 730 735
 Met Asp Thr Ser Val Lys Phe Asp Leu Gln Ile Gln Ser Ser Asn Leu
 740 745 750
 Phe Asp Lys Val Ser Pro Val Val Ser His Lys Val Asp Leu Ala Val
 755 760 765
 Leu Ala Ala Val Glu Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp His Val Phe
 770 775 780
 Leu Pro Ile Pro Asn Trp Glu His Lys Glu Asn Pro Glu Thr Glu Glu
 785 790 795 800
 Asp Val Gly Pro Val Val Gln His Ile Tyr Glu Leu Arg Asn Asn Gly
 805 810 815
 Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Met Leu His Leu Gln Trp Pro Tyr Lys
 820 825 830
 Tyr Asn Asn Asn Thr Leu Leu Tyr Ile Leu His Tyr Asp Ile Asp Gly
 835 840 845
 Pro Met Asn Cys Thr Ser Asp Met Glu Ile Asn Pro Leu Arg Ile Lys
 850 855 860
 Ile Ser Ser Leu Gln Thr Thr Glu Lys Asn Asp Thr Val Ala Gly Gln
 865 870 875 880
 Gly Glu Arg Asp His Leu Ile Thr Lys Arg Asp Leu Ala Leu Ser Glu
 885 890 895
 Gly Asp Ile His Thr Leu Gly Cys Gly Val Ala Gln Cys Leu Lys Ile
 900 905 910
 Val Cys Gln Val Gly Arg Leu Asp Arg Gly Lys Ser Ala Ile Leu Tyr
 915 920 925
 Val Lys Ser Leu Leu Trp Thr Glu Thr Phe Met Asn Lys Glu Asn Gln

ES 2 925 697 T3

930

935

940

Asn His Ser Tyr Ser Leu Lys Ser Ser Ala Ser Phe Asn Val Ile Glu
945 950 955 960

Phe Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Ile Glu Asp Ile Thr Asn Ser Thr Leu
965 970 975

Val Thr Thr Asn Val Thr Trp Gly Ile Gln Pro Ala Pro Met Pro Val
980 985 990

Pro Val Trp Val Ile Ile Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Leu
995 1000 1005

Ala Val Leu Val Phe Val Met Tyr Arg Met Gly Phe Phe Lys Arg
1010 1015 1020

Val Arg Pro Pro Gln Glu Glu Gln Glu Arg Glu Gln Leu Gln Pro
1025 1030 1035

His Glu Asn Gly Glu Gly Asn Ser Glu Thr
1040 1045

<210> 2

<211> 788

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Ala Thr Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
20 25 30

Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
35 40 45

Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
50 55 60

Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
65 70 75 80

Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
85 90 95

Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln

10

ES 2 925 697 T3

100	105	110
Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile 115 120 125		
Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met 130 135 140		
Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu 145 150 155 160		
Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg 165 170 175		
Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr 180 185 190		
Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr 195 200 205		
Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp 210 215 220		
Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg 225 230 235 240		
Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr 245 250 255		
Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu 260 265 270		
Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu 275 280 285		
Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp 290 295 300		
Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu 305 310 315 320		
Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val 325 330 335		
Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro 340 345 350		

ES 2 925 697 T3

Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln
 355 360 365
 Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg Ser Lys Val Glu Leu Glu
 370 375 380
 Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu Ser Phe Asn Ala Thr Cys
 385 390 395 400
 Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys Ser Cys Met Gly Leu Lys
 405 410 415
 Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu Ala Lys Val Arg Gly Cys
 420 425 430
 Pro Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile Lys Pro Val Gly Phe Lys
 435 440 445
 Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp Cys Asp Cys Ala Cys Gln
 450 455 460
 Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys Asn Asn Gly Asn Gly Thr
 465 470 475 480
 Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro Gly Trp Leu Gly Ser Gln
 485 490 495
 Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro Ser Gln Gln Asp Glu Cys
 500 505 510
 Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser Gln Arg Gly Glu Cys Leu
 515 520 525
 Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp Phe Gly Lys Ile Thr Gly
 530 535 540
 Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys Val Arg Tyr Lys Gly Glu
 545 550 555 560
 Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys Gly Asp Cys Leu Cys Asp
 565 570 575
 Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys Thr Thr Arg Thr Asp Thr
 580 585 590
 Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu
 595 600 605

ES 2 925 697 T3

Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly Ser Tyr Gly Asp Thr Cys
610 615 620

Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys
625 630 635 640

Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Gly Ala Leu His Asp Glu Asn Thr
645 650 655

Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys
660 665 670

Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp
675 680 685

Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile
690 695 700

Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu
705 710 715 720

Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala
725 730 735

Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu
740 745 750

Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala
755 760 765

Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr
770 775 780

Tyr Arg Gly Thr
785

REIVINDICACIONES

1. Cilengitida para su uso en el tratamiento o la prevención de septicemia en un paciente, en la que la cilengitida se administra al paciente por vía intravenosa.
- 5 2. Cilengitida para su uso según la reivindicación 1, para la prevención o inhibición temprana del desarrollo de septicemia en un paciente que tiene o se sospecha que tiene una infección bacteriana de la sangre.
- 10 3. Cilengitida para su uso según la reivindicación 1, para la prevención o inhibición temprana del desarrollo de septicemia grave o choque séptico en un paciente que tiene o se sospecha que tiene septicemia.
4. Cilengitida para su uso según cualquier reivindicación anterior, para el tratamiento de septicemia grave o choque séptico en un paciente.
- 15 5. Cilengitida para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que el paciente también se trata con una intervención seleccionada de: antibióticos intravenosos; líquidos intravenosos; e intervención específica de órganos.

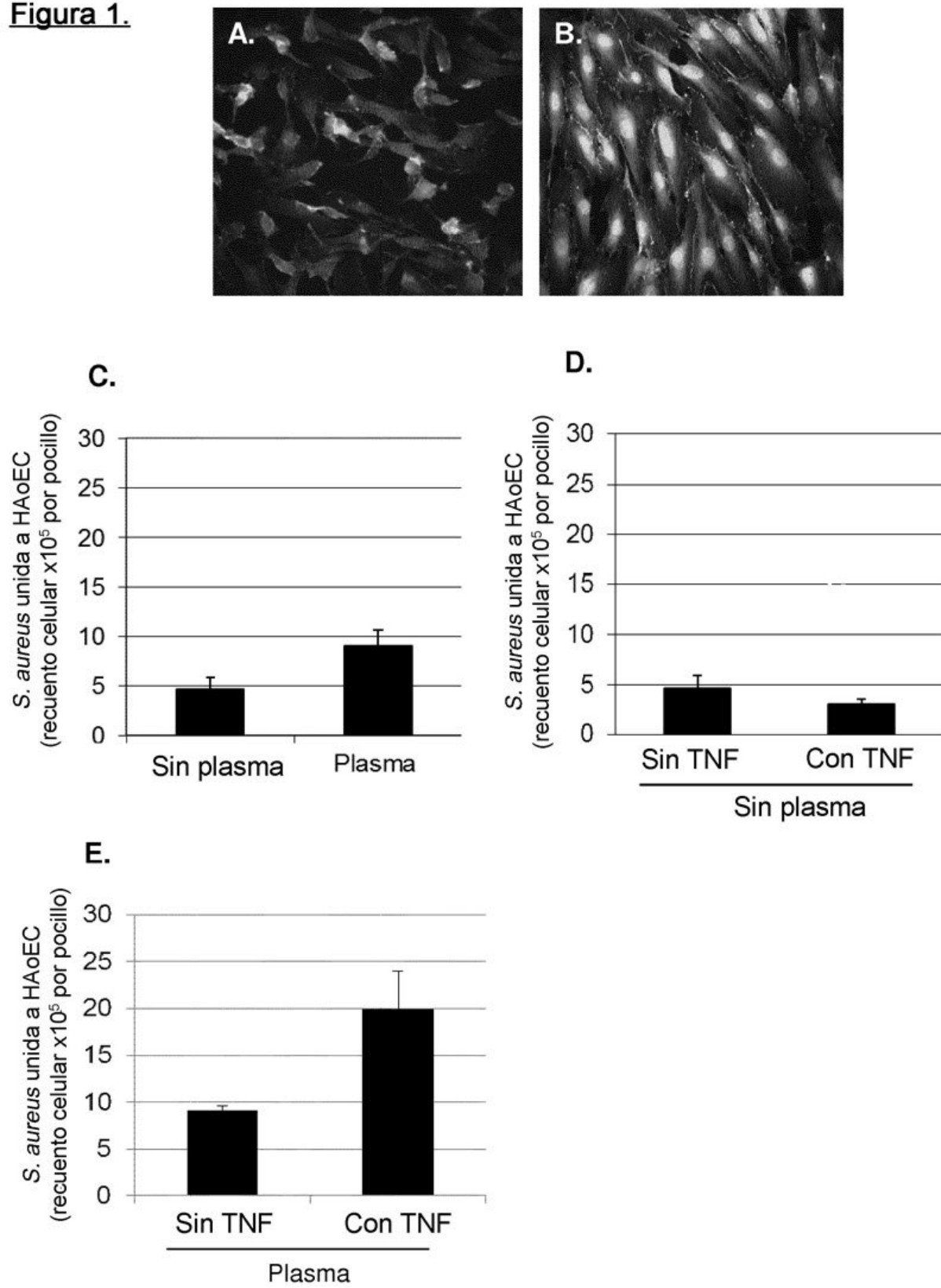
Figura 1.

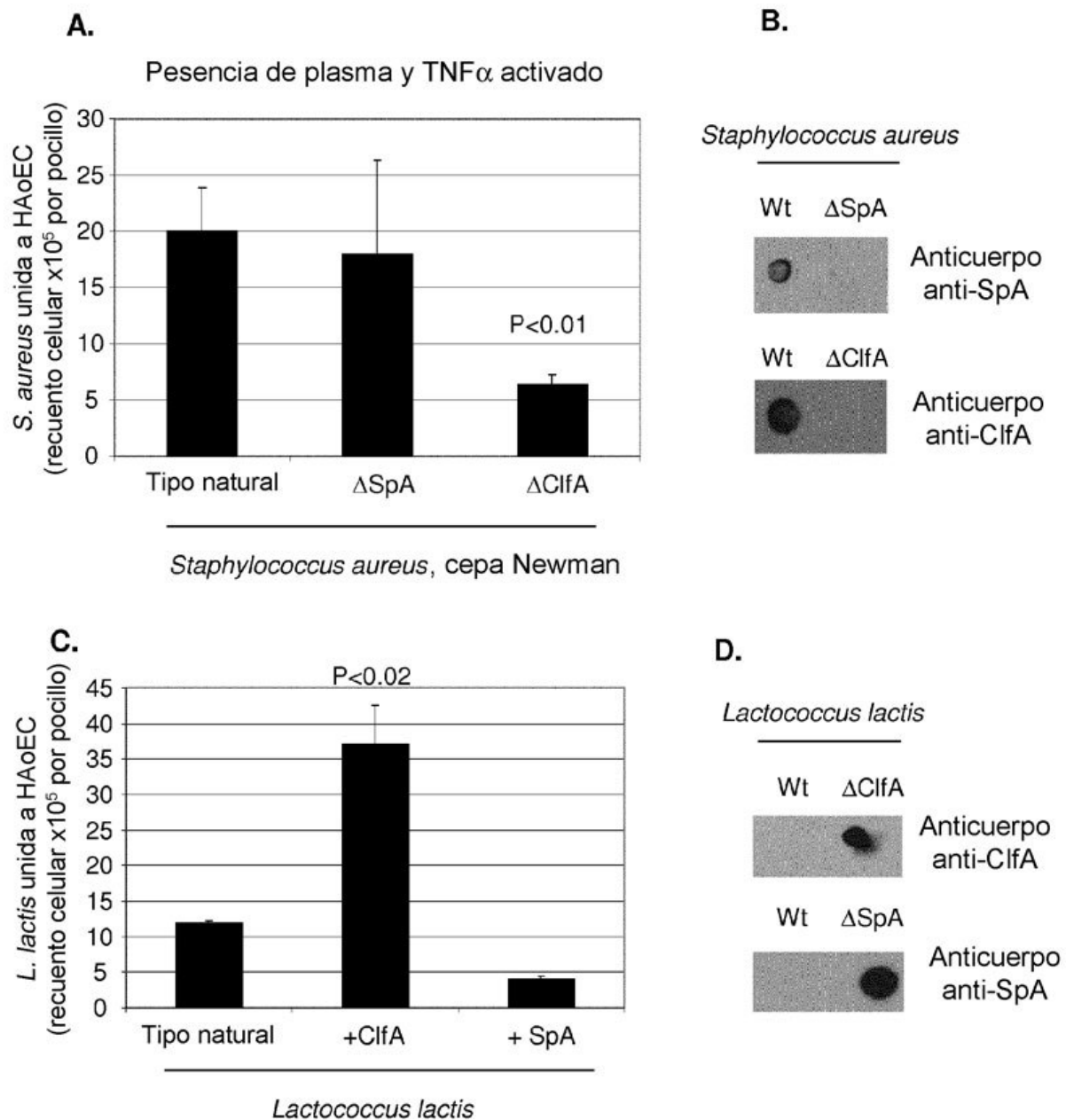
Figura 2.

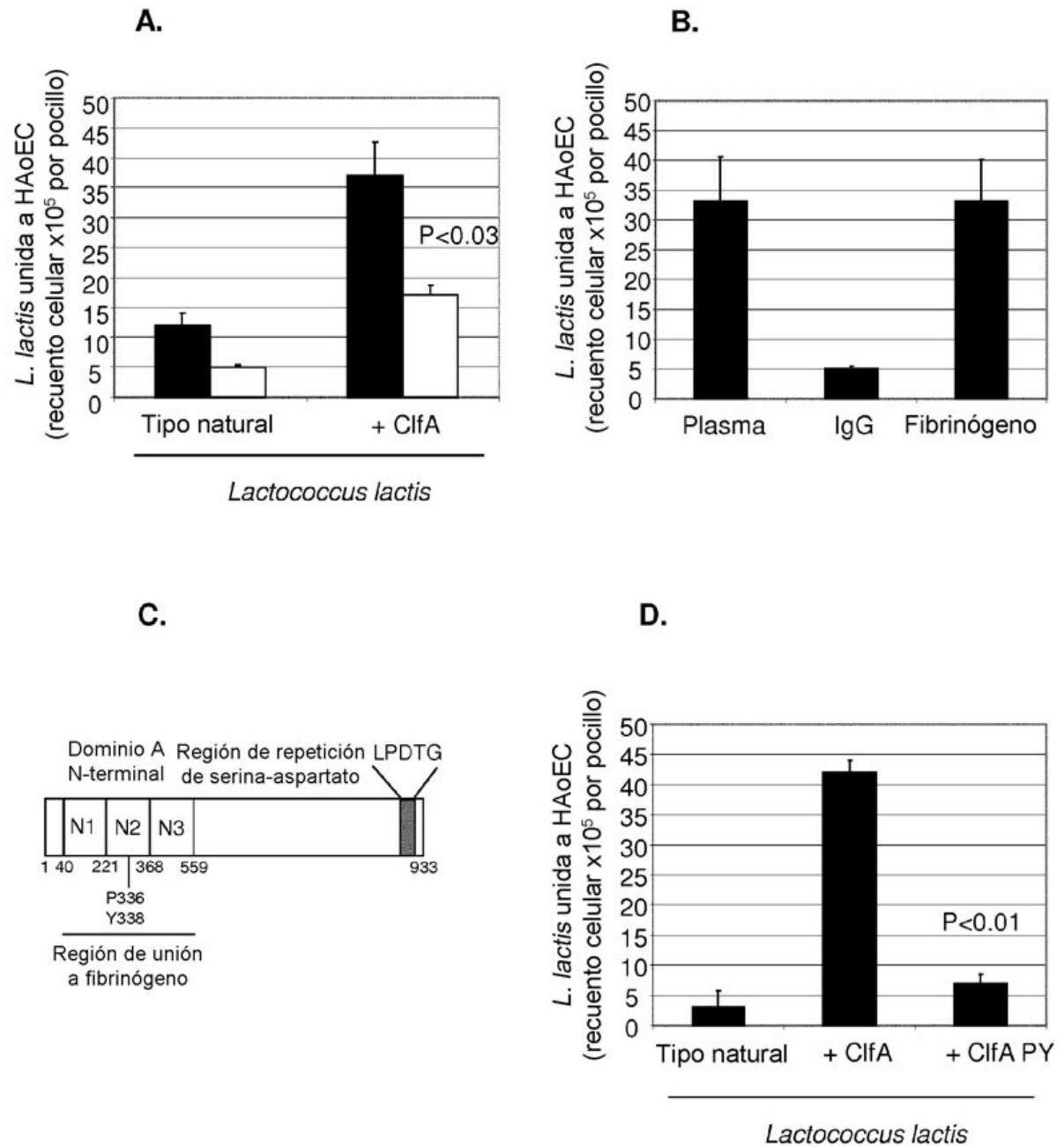
Figura 3.

Figura 4.

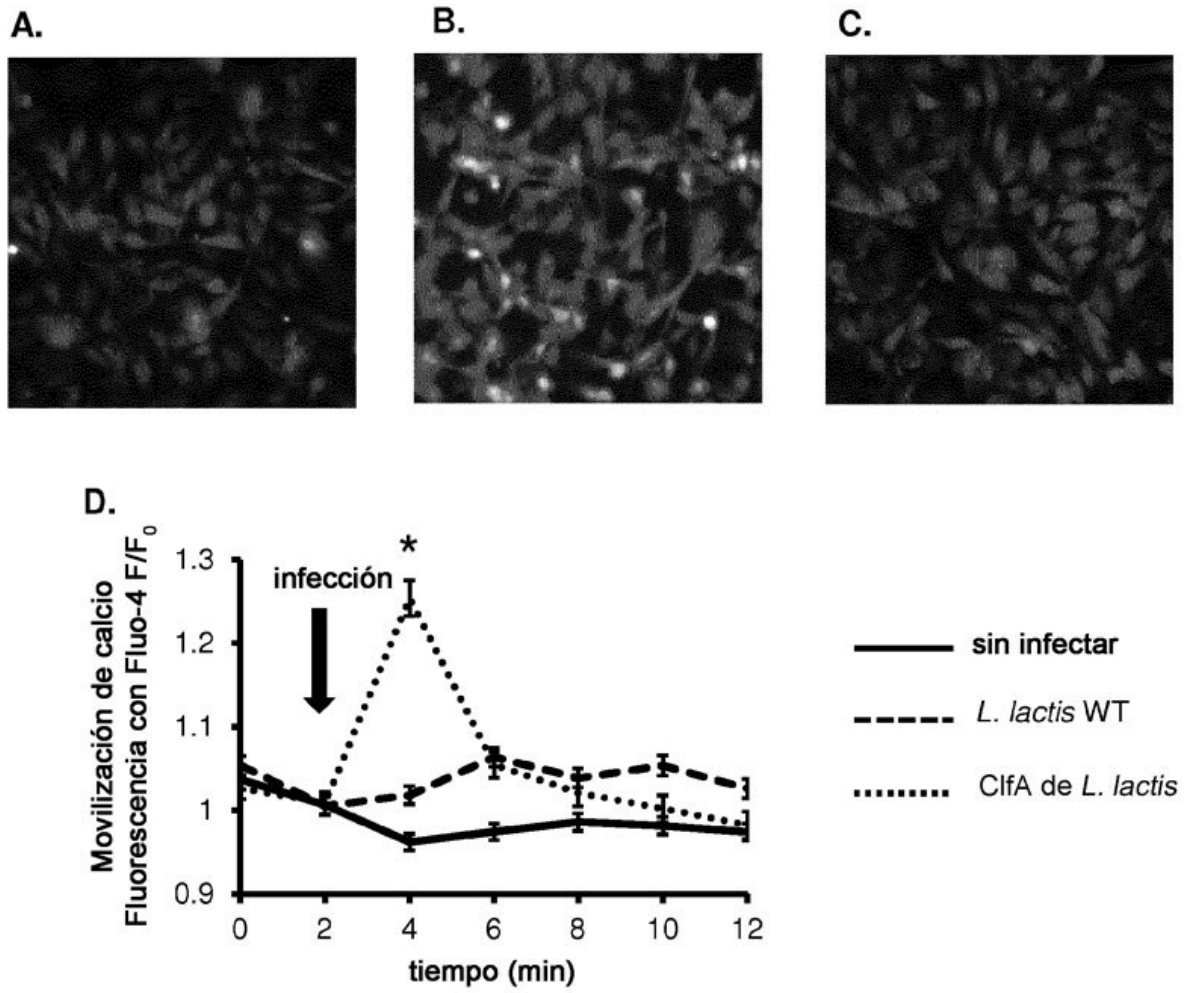


Figura 5.

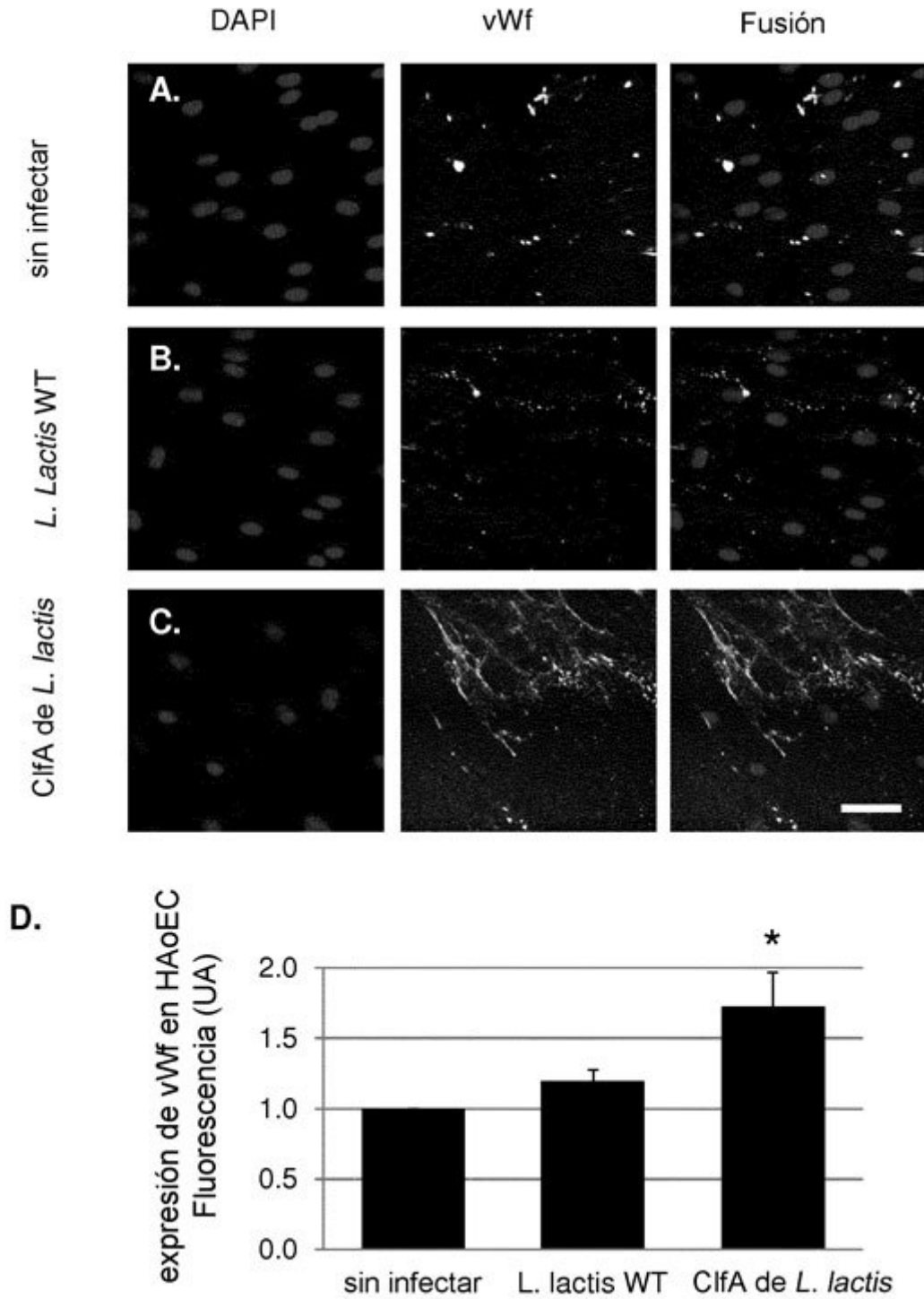


Figura 6.**A.**

Condición	Unión a LM609-PE (unidades de fl)	% de aumento	valor de p
En reposo (sin $\text{TNF}\alpha$)	25 ± 3	-	-
Activada (con $\text{TNF}\alpha$)	33 ± 2	$31 \pm X \%$	<0.05

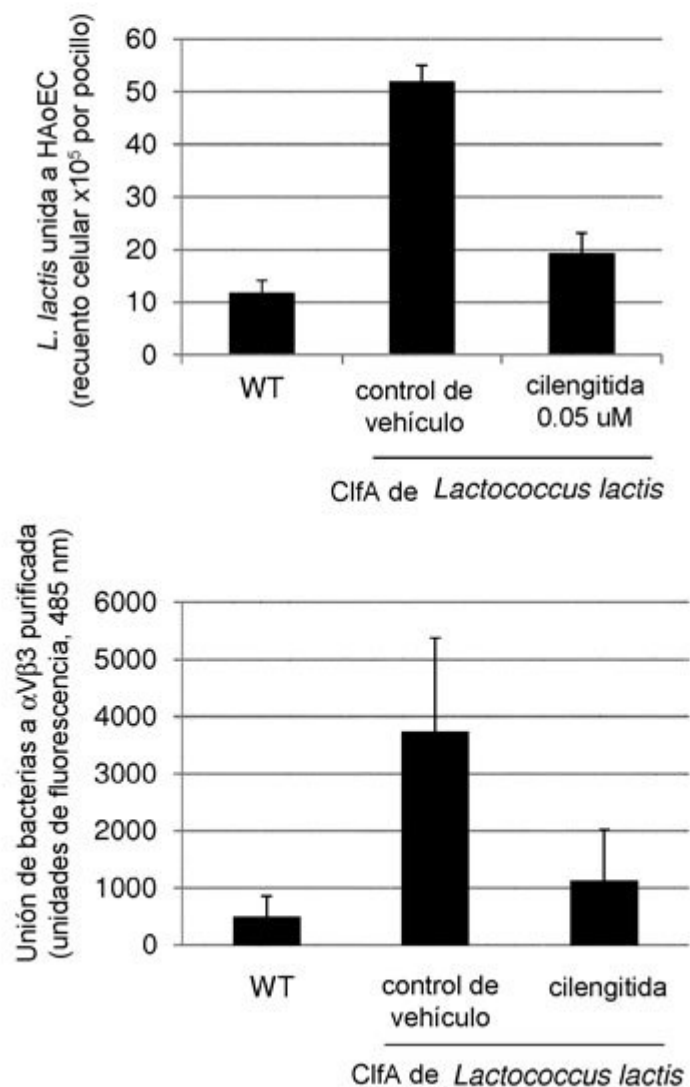
B.

Figura 7.

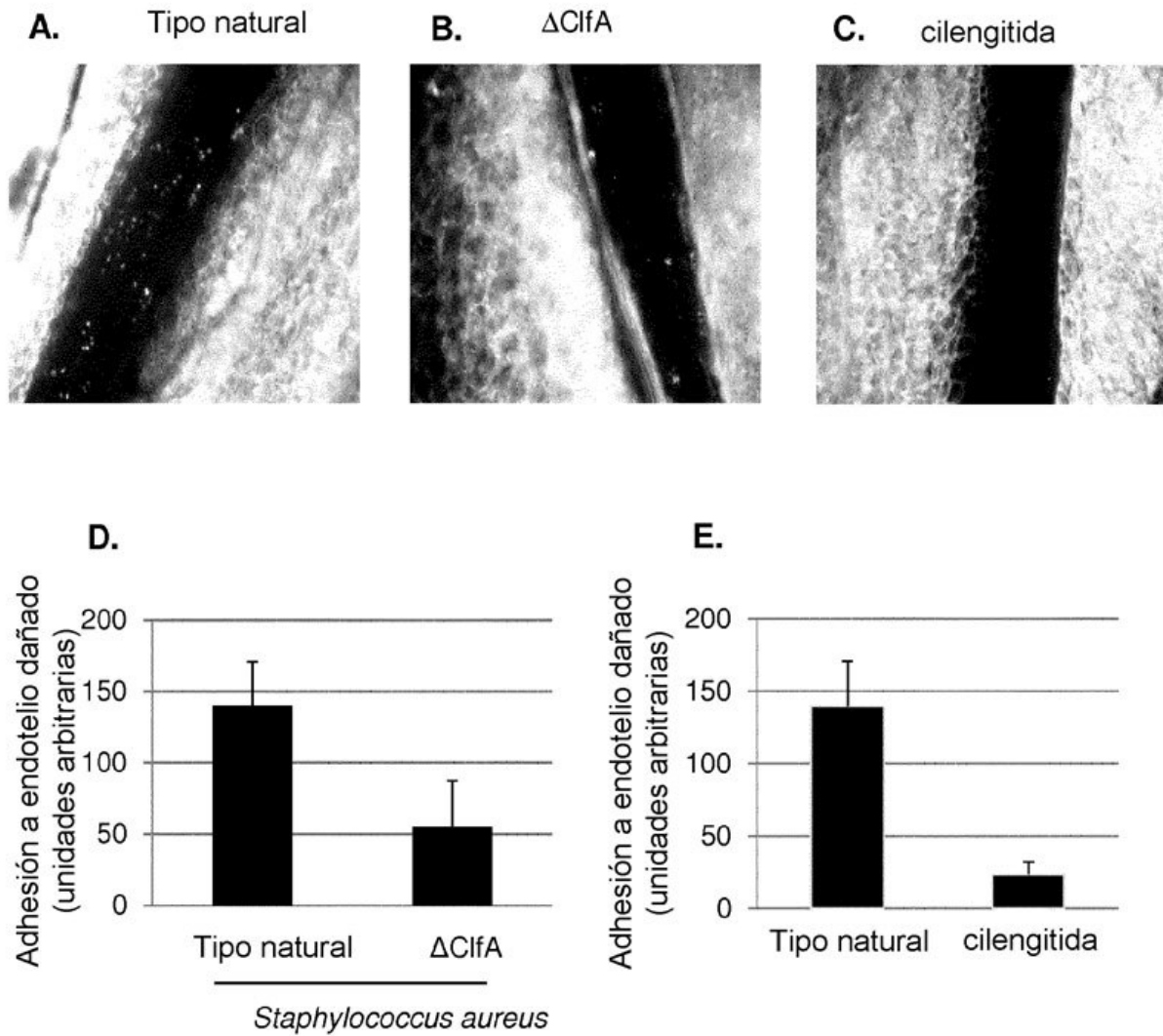


Figura 8.

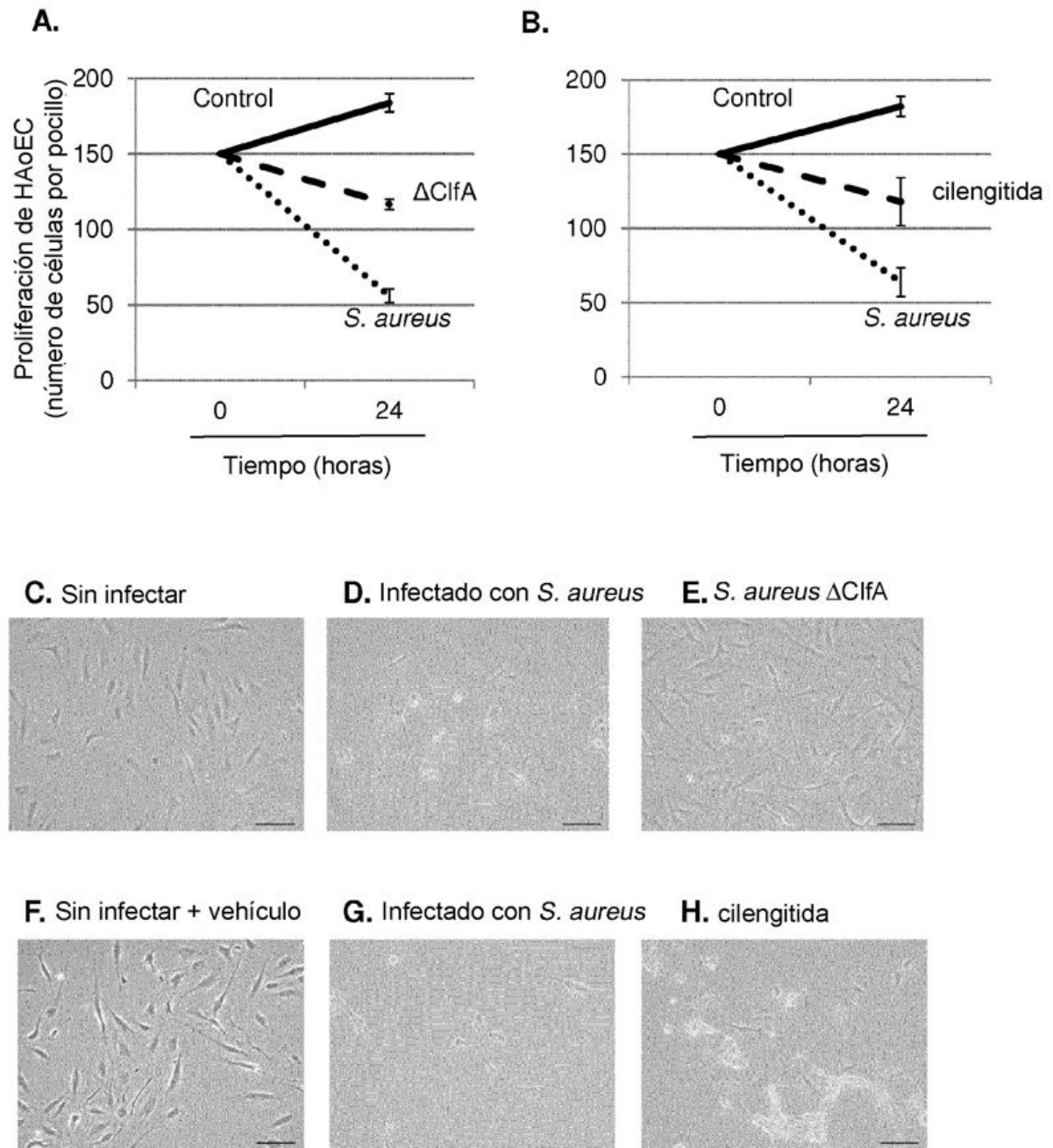


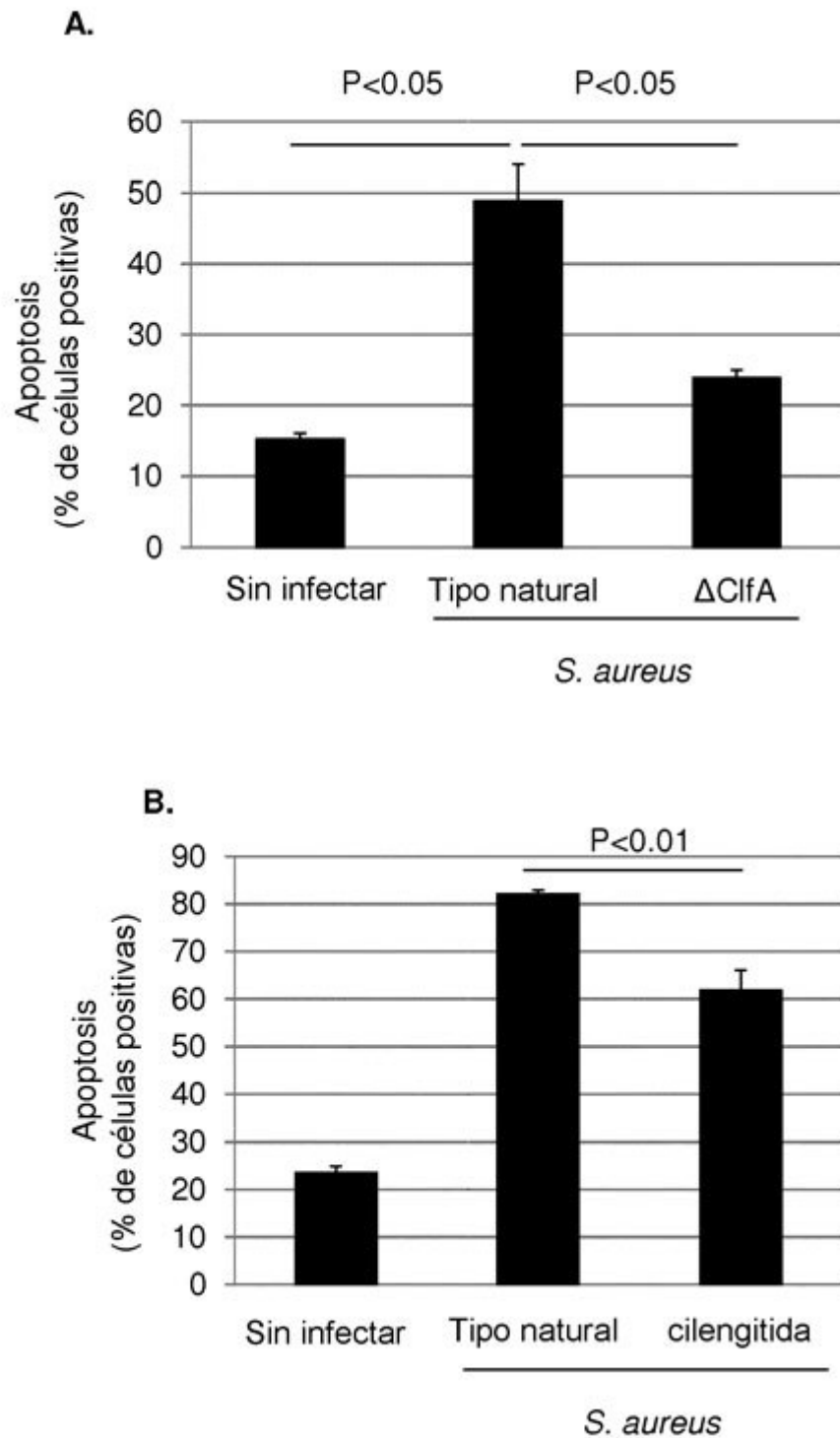
Figura 9.

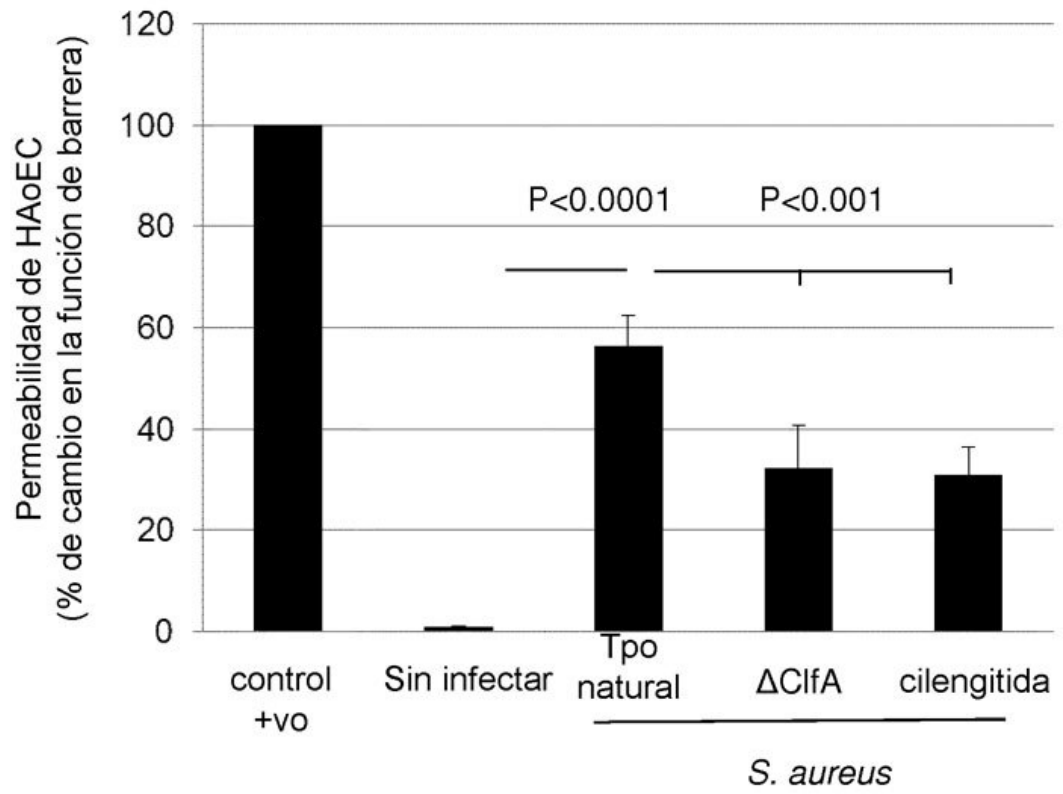
Figura 10.

Figura 11.

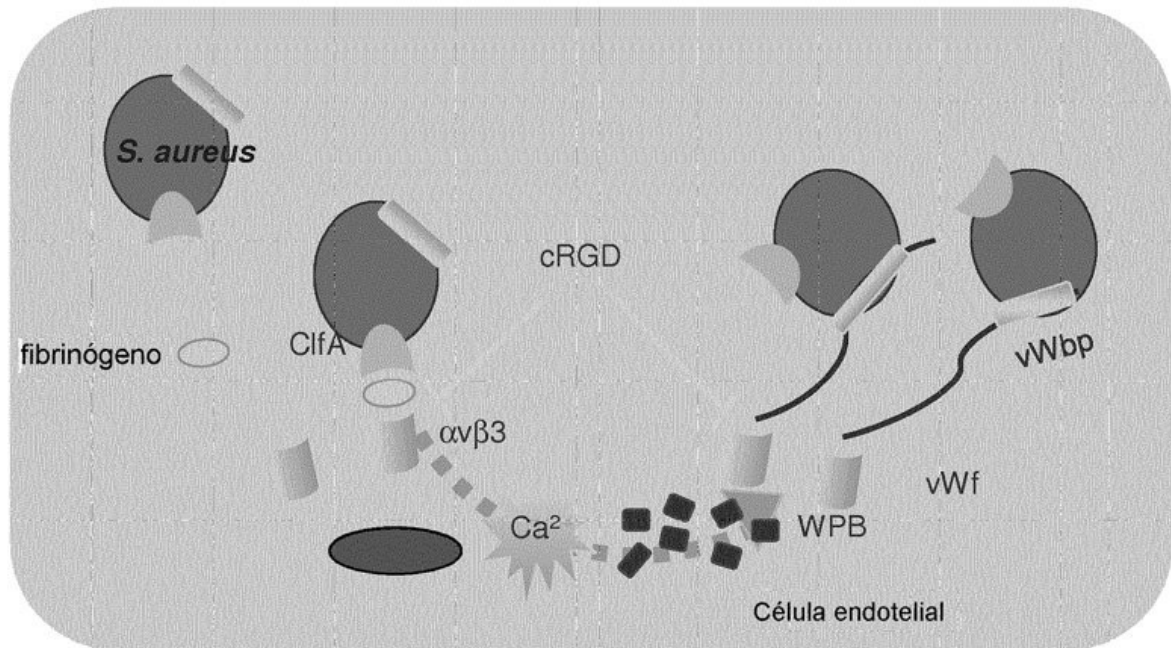


Figura 12.

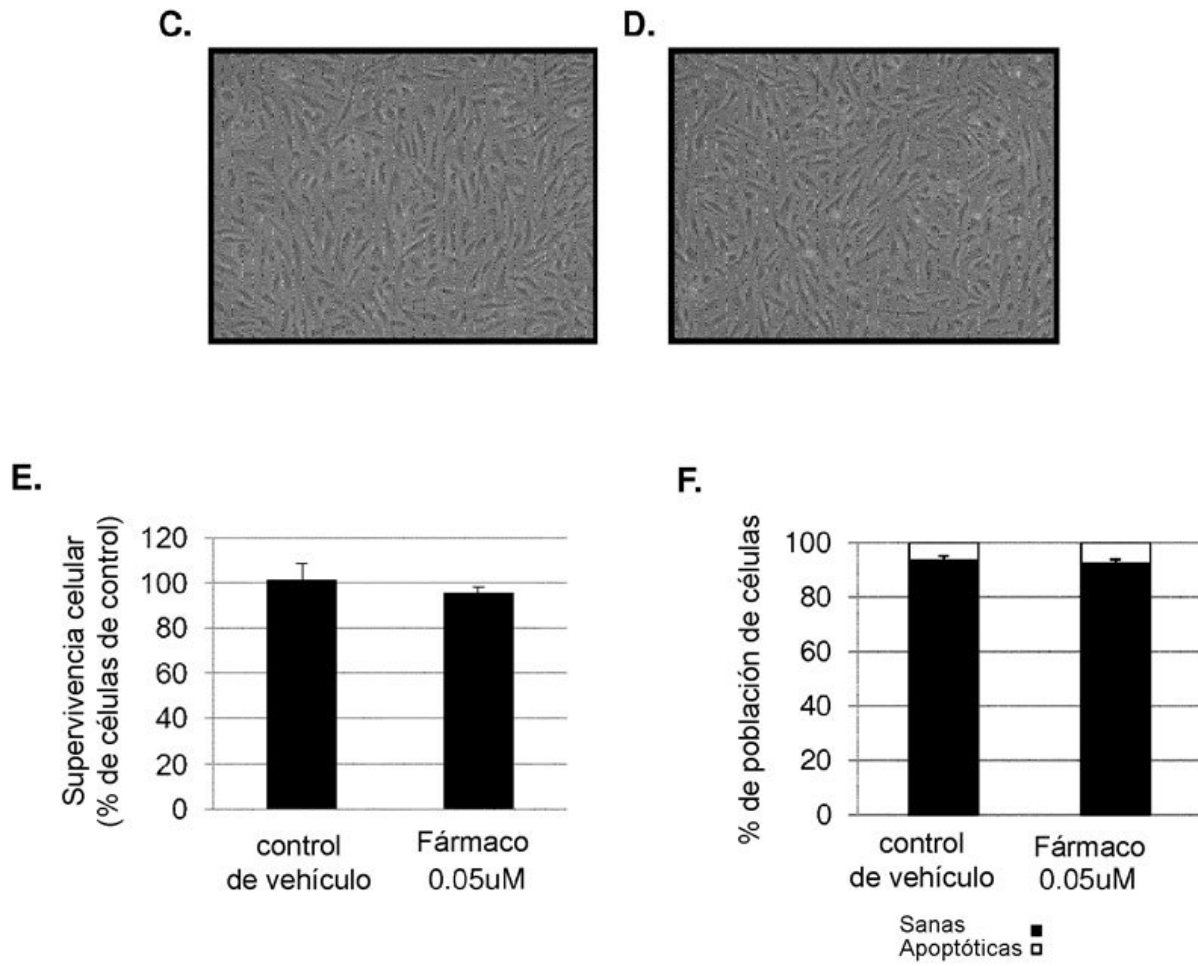


Figura 13.

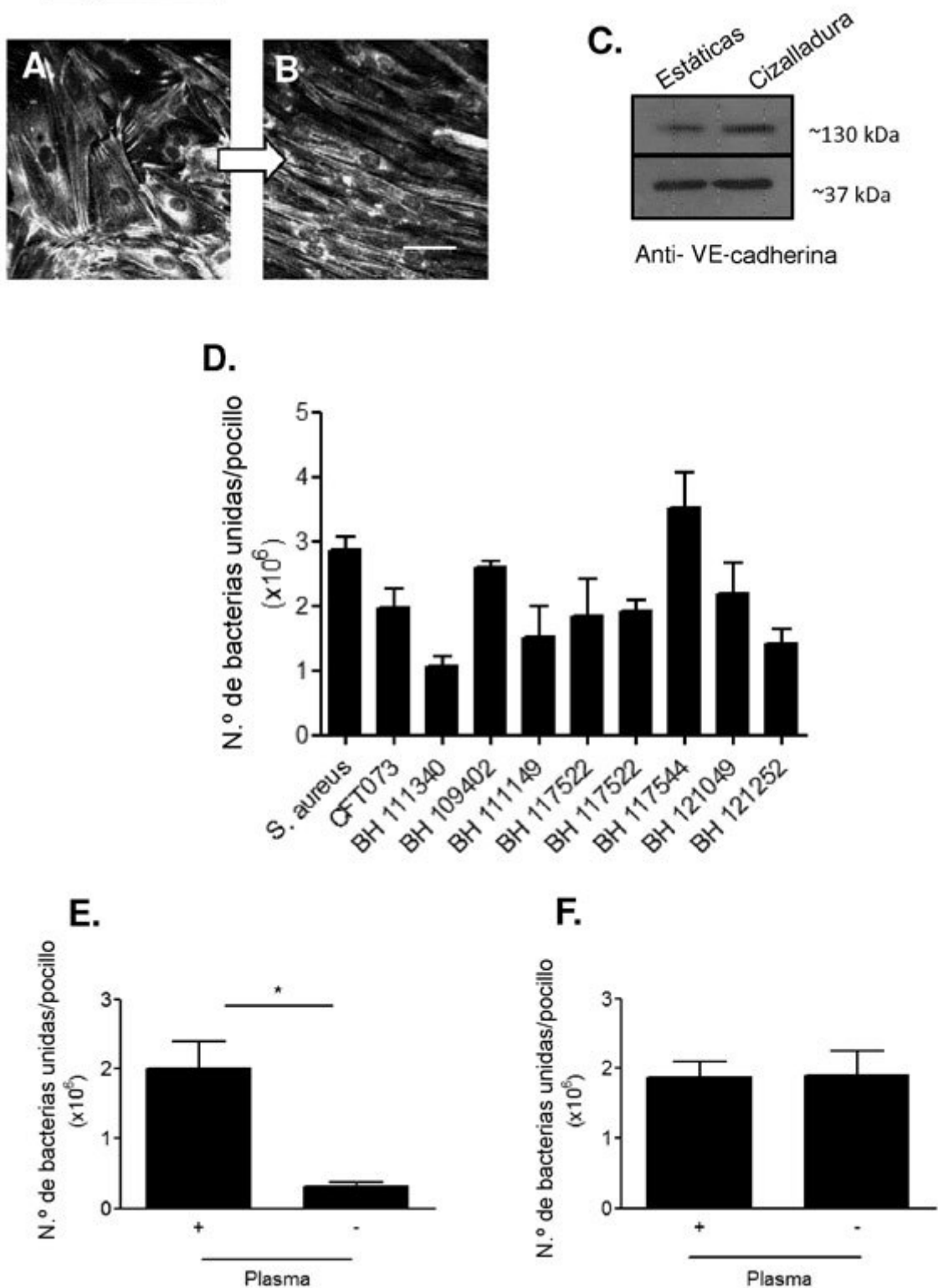


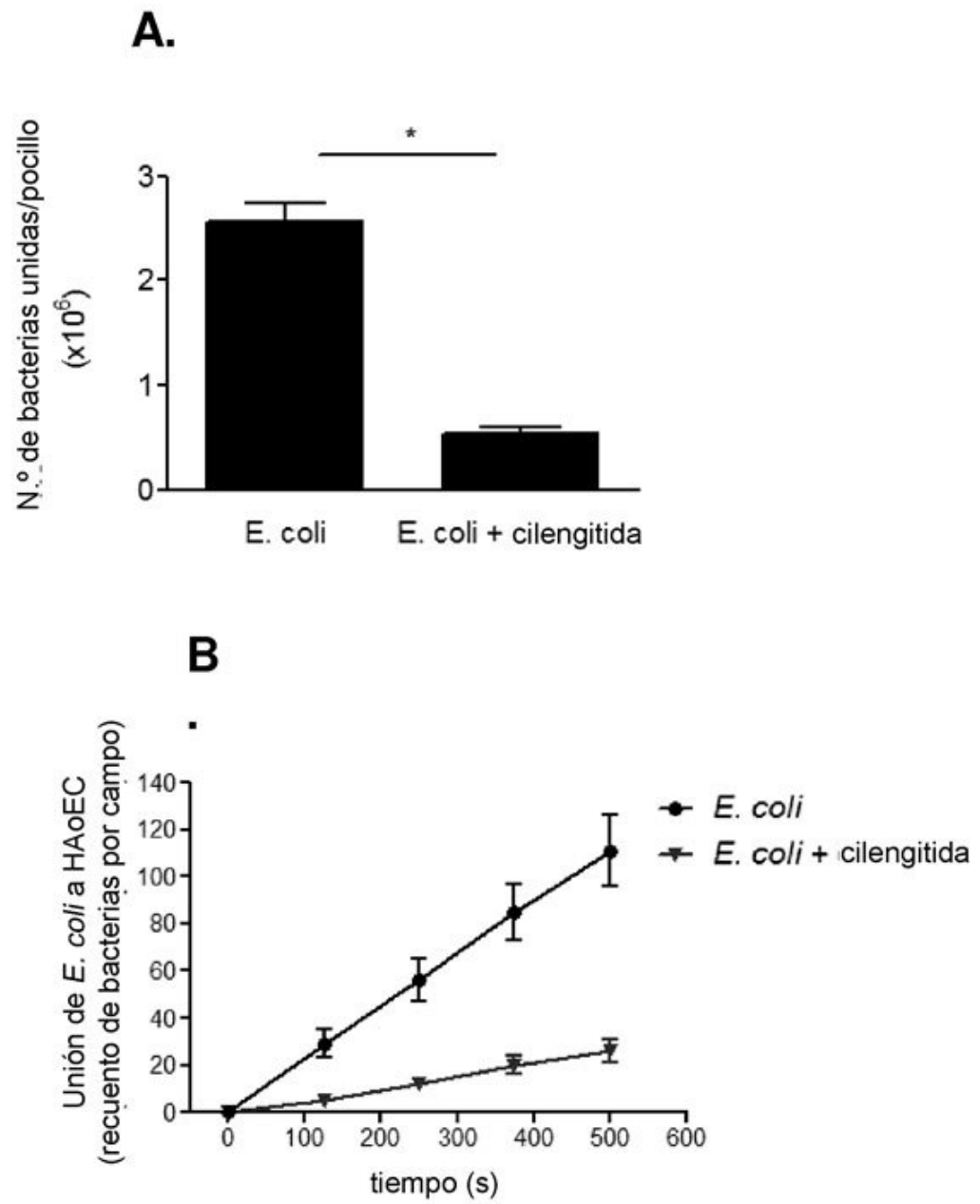
Figura 14.

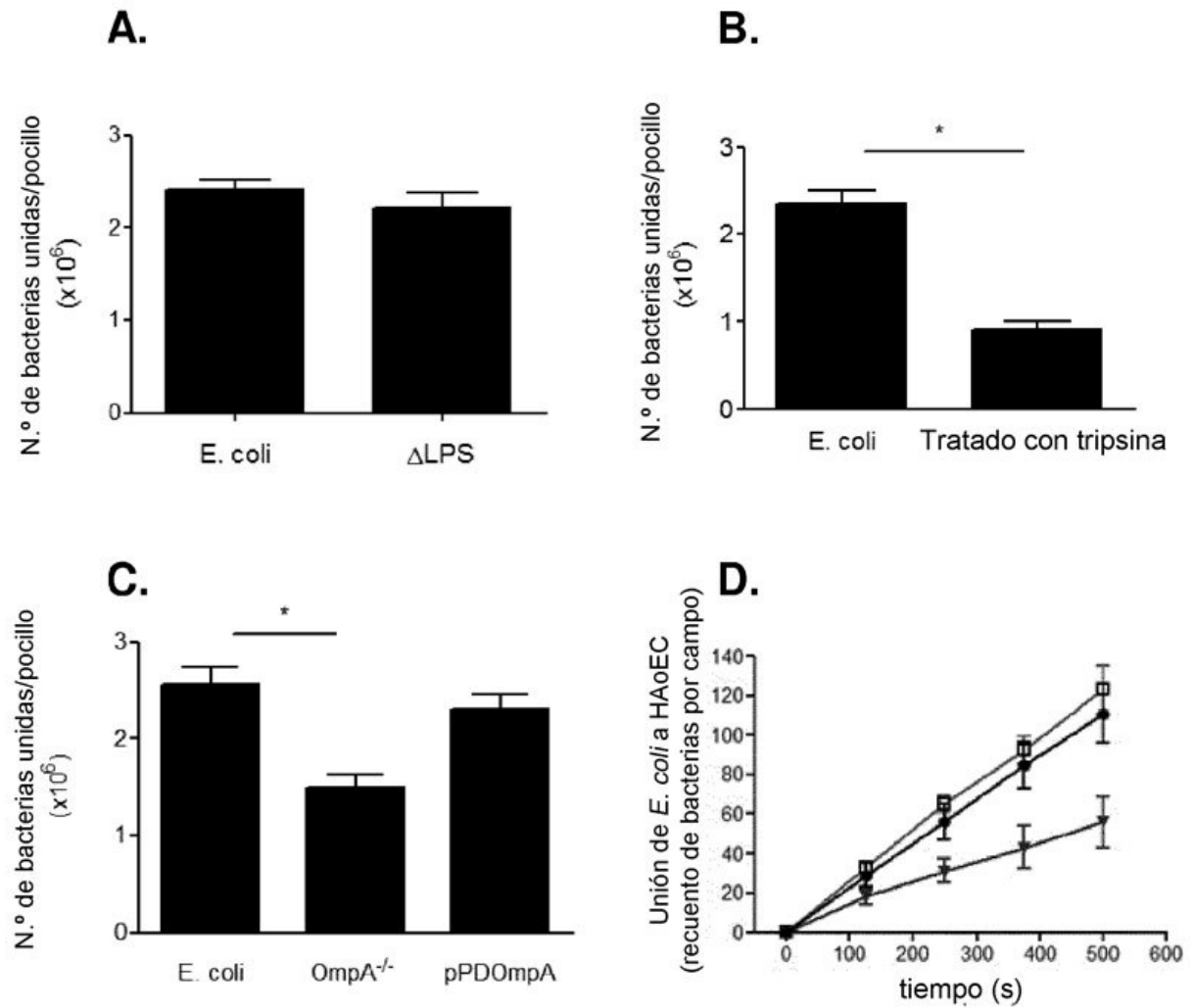
Figura 15.

Figura 15E.

Proteína	Función	Número de registro
Proteína de anillo M flagelar	SEK <u>R</u> GDSL <u>N</u>	WP 000994423.1
Proteína de ensamblaje flagelar fliH	WRL <u>R</u> G <u>D</u> PTL	AAN80816.1
Receptor de colicina I	HRDR <u>G</u> DTYN	AAN81146.1
Receptor hemo de membrana externa	SRDR <u>G</u> DLRQ	AAN82744.1
Maltoporina	SFGR <u>G</u> DSDE	WP_000973666.1
Proteína A de membrana externa	MPYK <u>G</u> DNIN	AAN79561.1

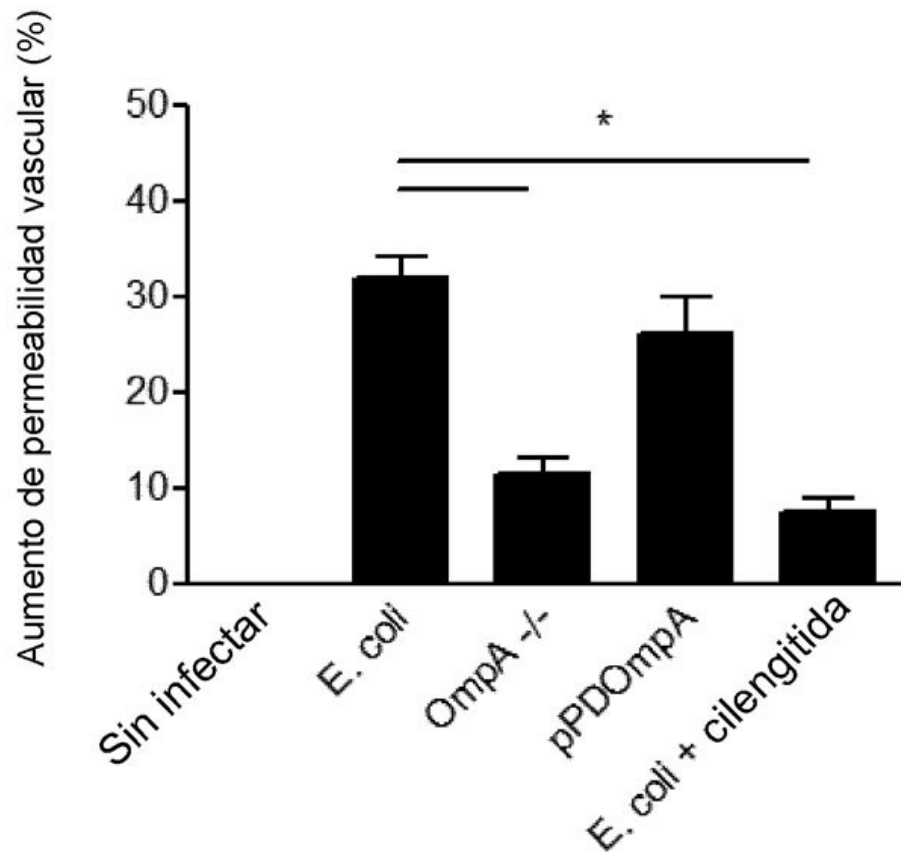
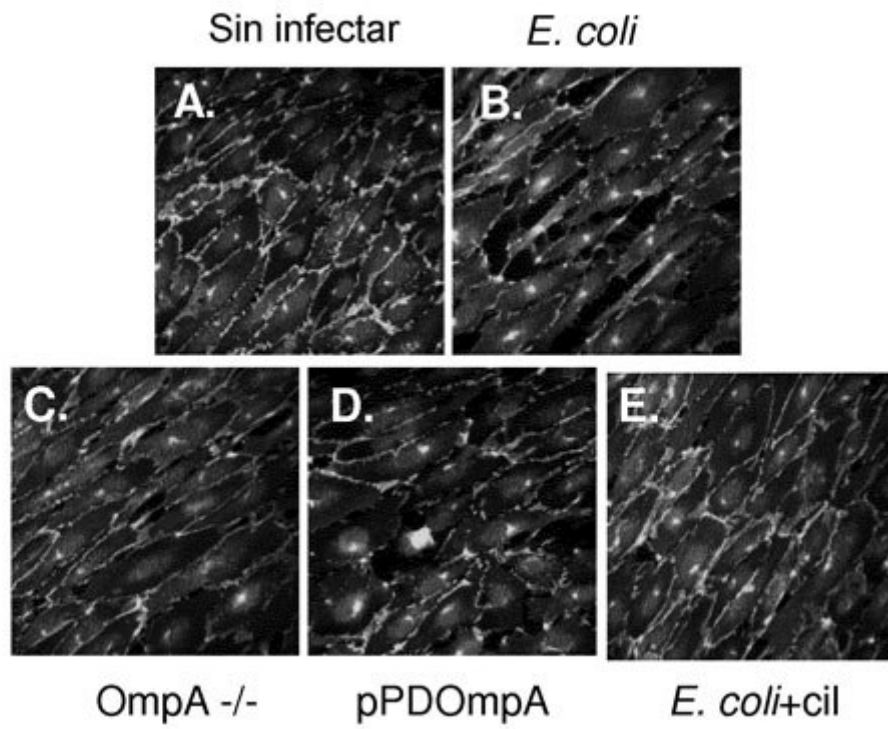
Figura 16.

Figura 17.



F.

