

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 406**

51 Int. Cl.:

A61K 33/26 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 39/04 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2021** **PCT/EP2021/063224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2021** **WO21233962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2021** **E 21725557 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 4153192**

54 Título: **Antagonistas de la ruta de CD44/ácido hialurónico para su uso en un método para el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas**

30 Prioridad:

19.05.2020 EP 20305520

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

20.11.2024

73 Titular/es:

INSTITUT CURIE (33.3%)
26 rue d'Ulm
75005 Paris, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE
LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)

72 Inventor/es:

RODRIGUEZ, RAPHAËL;
MULLER, SEBASTIAN;
SOLIER, STÉPHANIE y
WATSON, SARAH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 988 406 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

Antagonistas de la ruta de CD44/ácido hialurónico para su uso en un método para el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS). La invención también se refiere a métodos para el diagnóstico de pacientes que padecen síndrome de liberación de citocinas.

Antecedentes de la invención

- 10 Trabajos recientes han mostrado que el síndrome de liberación de citocinas (CRS) es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con SARS-CoV-2, donde la interleucina 6 (IL6) elevada se correlaciona con insuficiencia respiratoria (Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 1 de mayo de 2020; 368(6490): 473-474. doi: 10.1126/science.abb8925). También se ha demostrado que CD44/hialuronato (HA) regulan la expresión del gen de quimiocina en macrófagos alveolares (McKee *et al.*, Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. *The role of HA size and CD44*. *J Clin Invest*. 15 de noviembre de 1996; 98(10):2403-13. DOI: 10.1172/JCI119054). Además, se ha demostrado que los niveles de ferritina están muy regulados por incremento en pacientes con SARS-CoV-2 con síntomas graves (Zhou *et al.*, Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China, a retrospective cohort study. *The Lancet* (2020) DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)), sugiriendo un papel causal del hierro en la fisiopatología de Covid-19.
- 20 Perricone *et al* (Authorea, Inc, DOI: 10.22541/au.158880283.3460 4328) se refieren al papel de la terapia de agotamiento de hierro en el contexto de COVID-19 como parte de los síndromes hiperferritinémicos. Dalamaga *et al* (2020, *Metabolism, Clinical and experimental*, 108, 154260) se refieren a la posible utilidad de quelantes de hierro como adyuvante para regímenes de tratamiento de COVID-19.

- 25 Los inventores han desentrañado recientemente el papel funcional de CD44, un receptor de membrana plasmática de Hyal implicado en la regulación de transiciones epitelio-mesenquimatosas, progresión del cáncer, respuestas inmunitarias e inflamación. Específicamente, los inventores han descubierto que CD44 media en la endocitosis de Hyal unido a hierro en células cancerosas y células T inmunitarias. En este contexto, los inventores han demostrado que el hierro desempeña un papel central en la regulación de la plasticidad epigenética y la identidad celular, actuando como catalizador metálico para promover la desmetilación de las marcas de histona represivas H3K9me2 y H3K27me3. Durante el curso de este estudio, los inventores encontraron que el gen que codifica el receptor de IL6 (IL6R/CD126) es uno de los genes regulados por hierro superiores, donde el hierro (y, por tanto, CD44/Hyal) media en el agotamiento de H3K9me2 conduciendo a la regulación por incremento de IL6R. De manera importante, los inventores también han mostrado que anticuerpos anti-CD44 pueden bloquear la endocitosis del hierro, antagonizando este efecto. Este trabajo ha suscitado un considerable interés internacional en la amplia comunidad científica, incluidos científicos de investigación básica y médicos por igual (Müller *et al.*, CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis, *BioRxiv*, DOI: <https://doi.org/10.1101/693424>, aceptado en *Nature Chemistry*).
- 30
- 35

- 40 En el presente documento, los inventores demuestran que, durante la activación de macrófagos M1, la endocitosis del hierro se regula por incremento de una manera dependiente de CD44 y que los niveles de proteína CD44 aumentan. Este efecto es específico para macrófagos M1, mientras que los niveles de la proteína canónica de endocitosis del hierro TfR1/CD71 permanecen sin cambios. En conjunto, estos datos están insinuando un papel directo de la endocitosis del hierro mediada por CD44 en la respuesta inflamatoria grave observada en pacientes con SARS-CoV-2.

Tampoco hay ninguna divulgación en la técnica del uso de antagonistas de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS), particularmente en pacientes con SARS-CoV-2.

Resumen de la invención

La invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS). La invención también se refiere a métodos para el diagnóstico de pacientes que padecen síndrome de liberación de citocinas (CRS). En particular, la invención se define por las reivindicaciones.

- 50 En un aspecto de la divulgación, la presente invención se refiere a un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico o a una composición farmacéutica que lo comprende para su uso en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas en un sujeto que lo necesita, en donde dicho antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) se selecciona del grupo que consiste en un compuesto que se dirige a CD44 seleccionado del grupo que consiste en antagonistas de CD44 e inhibidores de la expresión de CD44. Se refiere además al uso de un compuesto que se dirige a CD44 seleccionado del grupo que consiste en antagonistas de CD44 e inhibidores de la expresión de CD44 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas en un sujeto que lo necesita.
- 55 También se refiere a un método para el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas en un sujeto que lo

necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se dirige a CD44 seleccionado del grupo que consiste en antagonistas de CD44 e inhibidores de la expresión de CD44, previniendo o disminuyendo de este modo el síndrome de liberación de citocinas.

5 En un aspecto particular, el síndrome de liberación de citocinas es un síndrome de liberación de citocinas relacionado con COVID-19 grave.

Opcionalmente, dicho antagonista de CD44 se selecciona del grupo que consiste en molécula orgánica pequeña, polipéptido, aptámero o anticuerpo. Por ejemplo, dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en RG7356 y Bivatuzumab.

10 Opcionalmente, dicho inhibidor de la expresión de CD44 se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido antisentido, ARNhc, ARNip, iARN y ribozima.

Descripción detallada de la invención

15 Los inventores investigan la homeostasis del hierro y el papel de la endocitosis del hierro mediada por CD44 en la respuesta inflamatoria grave y el síndrome de liberación de citocinas (CRS), particularmente en pacientes con SARS-CoV-2. Los inventores demuestran que, durante la activación de macrófagos M1, la endocitosis del hierro se regula por incremento de una manera dependiente de CD44 y que los niveles de proteína CD44 aumentan. Este efecto es específico para macrófagos M1, mientras que los niveles de la proteína canónica de endocitosis del hierro Tfr1/CD71 permanecen sin cambios. En la presente invención, los inventores proporcionan pruebas *in vitro* hacia un papel directo de la endocitosis del hierro mediada por CD44 en la respuesta inflamatoria grave tal como el síndrome de liberación de citocinas (CRS) observado en pacientes con SARS-CoV-2. En conjunto, la presente invención destaca el papel de la endocitosis del hierro mediada por CD44 en la respuesta inflamatoria grave y el síndrome de liberación de citocinas (CRS), y el uso potencial de antagonistas de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) y el direccionamiento de la homeostasis del hierro en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS), particularmente en pacientes con SARS-CoV-2. La invención también identifica CD44 como un nuevo marcador de predisposición a COVID-19 grave.

25 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere al direccionamiento de la homeostasis del hierro en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS), particularmente CRS relacionado con COVID-19 grave. La invención también se refiere al direccionamiento de la homeostasis del hierro en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), particularmente ARDS relacionado con COVID-19 grave. La invención también se refiere al direccionamiento de la homeostasis del hierro en el tratamiento del síndrome de activación de macrófagos (MAS), particularmente MAS relacionado con COVID-19 grave. La invención también se refiere al direccionamiento de la homeostasis del hierro en el tratamiento de enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y respuestas inflamatorias alveolares, particularmente enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y respuestas inflamatorias alveolares en pacientes con COVID-19. La invención también se refiere al direccionamiento de la homeostasis del hierro en el tratamiento de COVID-19, particularmente COVID-19 grave.

35 Método terapéutico

En un primer aspecto, la invención se refiere a un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS) en un sujeto que lo necesita.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso en el tratamiento de CRS relacionado con COVID-19 grave en un sujeto que lo necesita.

40 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (ARDS) en un sujeto que lo necesita.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso en el tratamiento del síndrome de activación de macrófagos (MAS) en un sujeto que lo necesita.

45 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y respuestas inflamatorias alveolares en un sujeto que lo necesita.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso en el tratamiento de COVID-19, particularmente COVID-19 grave en un sujeto que lo necesita.

50 Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" son intercambiables y se refieren a un mamífero. Normalmente, un sujeto de acuerdo con la invención se refiere a cualquier sujeto, preferiblemente ser humano. En una realización particular, el término "sujeto" se refiere a un sujeto aquejado o en riesgo de estar aquejado de síndrome de liberación de citocinas (CRS), particularmente CRS relacionado con COVID-19. En una realización particular, el término "sujeto" se refiere a un sujeto aquejado o en riesgo de estar aquejado de síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), particularmente ARDS relacionado con COVID-19 grave. En una realización particular,

el término “sujeto” se refiere a un sujeto aquejado o en riesgo de estar aquejado de síndrome de activación de macrófagos (MAS), particularmente MAS relacionado con COVID-19 grave. En una realización particular, el término “sujeto” se refiere a un sujeto aquejado o en riesgo de estar aquejado de enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y respuestas inflamatorias alveolares, particularmente enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y respuestas inflamatorias alveolares en pacientes con COVID-19. En una realización particular, el término “sujeto” se refiere a un sujeto aquejado o en riesgo de estar aquejado de COVID-19, particularmente COVID-19 grave.

Como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” o “tratar” se refiere tanto al tratamiento profiláctico o preventivo, así como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluido el tratamiento de sujetos en riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha que han contraído la enfermedad, así como sujetos que están enfermos o se les ha diagnosticado que padecen una enfermedad o afección médica, e incluye la supresión de la recaída clínica. El tratamiento puede administrarse a un sujeto que tiene un trastorno médico o que finalmente puede adquirir el trastorno, con el fin de prevenir, curar, retrasar el inicio, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de la esperada en ausencia de tal tratamiento. Por “régimen terapéutico” quiere decirse el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación usado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. La expresión “régimen de inducción” o “período de inducción” se refiere a un régimen terapéutico (o la porción de un régimen terapéutico) que se usa para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel de fármaco a un sujeto durante el período inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o en su totalidad) un “régimen de carga”, que puede incluir administrar una dosis mayor del fármaco que la que un médico emplearía durante un régimen de mantenimiento, administrar un fármaco con más frecuencia de la que un médico administraría el fármaco durante un régimen de mantenimiento, o ambos. La expresión “régimen de mantenimiento” o “período de mantenimiento” se refiere a un régimen terapéutico (o la porción de un régimen terapéutico) que se usa para el mantenimiento de un sujeto durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al sujeto en remisión durante largos períodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear terapia continua (por ejemplo, administrar un fármaco a intervalos regulares, por ejemplo, de manera semanal, mensual, anual, etc.) o terapia intermitente (por ejemplo, tratamiento interrumpido, tratamiento intermitente, tratamiento en recaída o tratamiento tras lograr un criterio predeterminado particular [por ejemplo, manifestación de la enfermedad, etc.]).

Como se usa en el presente documento, el término “síndrome de liberación de citocinas” o “CRS” tiene su significado general en la técnica y se refiere a una enfermedad causada por una liberación grande y rápida de citocinas en la sangre a partir de células inmunitarias. El término “síndrome de liberación de citocinas” o “CRS” también se refiere a una respuesta inflamatoria sistémica observada después de la administración de anticuerpos, y la terapia adoptiva de células T o reacciones de citocinas que se producen en enfermedades infecciosas tales como enfermedad por coronavirus de 2019 (COVID-19), septicemia, Ébola, gripe aviar y enfermedades no infecciosas tales como enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) (Shimabukuro-Vomernhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer*. 15 de junio de 2018; 6(1):56. doi:10.1186/s40425-018-0343-9). El término “síndrome de liberación de citocinas” o “CRS” se refiere, tal como se describe en el Diccionario de Términos del Cáncer del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) a una afección que puede producirse después del tratamiento con algunos tipos de inmunoterapia, tales como anticuerpos y células CAR-T y provocada por una liberación grande y rápida de citocinas en la sangre de células inmunitarias afectadas por la inmunoterapia. El CRS es la toxicidad aguda más común de las células T CAR, el CRS está relacionado con un proceso inflamatorio sistémico progresivo y se caracteriza por fiebre alta, hipotensión, hipoxia, toxicidades neurológicas y/o toxicidad multiorgánica (Davila *et al.*, Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 19 de febrero de 2014;6(224):224ra25. doi: 10.1126/scitranslmed). La gravedad del CRS puede variar desde síntomas leves incluyendo fiebre, mialgia y fatiga, hasta síntomas graves incluyendo pero sin limitarse a síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), hipotensión, coagulación intravascular diseminada, toxicidades renales y hepáticas, disfunción orgánica, un aumento en los perfiles de citocinas tales como IL6, IL2R, IL-1 beta y/o neurotoxicidad (Shalabi *et al.*, Novel Designs of Early Phase Trials for Cancer Therapeutics. Capítulo 12 - Cell-Based Therapies: A New Frontier of Personalized Medicine. Editor(es): Shivaani Kummar, Chris Takimoto. Academic Press, 2018, páginas 175-191, ISBN 9780128125120, doi.org/10.1016/B978-0-12-812512-0.00012-9; Maude *et al.*, Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J*. Marzo-abril de 2014; 20(2):119-22. doi: 10.1097/PPO.000000000000035). El síndrome de liberación de citocinas también puede estar asociado con hallazgos del síndrome de activación de macrófagos (MAS)/linfocitosis hemofagocítica (HLH). El término “síndrome de liberación de citocinas” también se refiere a CRS relacionado con COVID, particularmente CRS relacionado con COVID-19 grave. Trabajos recientes han mostrado que el síndrome de liberación de citocinas (CRS) es la causa principal de morbilidad y mortalidad en pacientes con SARS-CoV-2, donde la IL6 elevada se correlaciona con insuficiencia respiratoria (Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 1 de mayo de 2020; 368(6490): 473-474. doi: 10.1126/science.abb8925).

Como se usa en el presente documento, el término “síndrome de dificultad respiratoria del adulto” o “ARDS” tiene su significado general en la técnica y se refiere a un proceso inflamatorio pulmonar agudo e intenso provocado por ataques pulmonares o sistémicos, lo más comúnmente iniciados por neumonía, enfermedades infecciosas, septicemia

o traumatismo (Ranieri *et al.*, ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition. JAMA. 20 de junio de 2012; 307(23):2526-33. doi:10.1001/jama.2012.5669; Hernández-Beeftink *et al.*, Genomics and the Acute Respiratory Distress Syndrome: Current and Future Directions. Int J Mol Sci. 16 de agosto de 2019; 20(16). pii: E4004. doi: 10.3390/ijms20164004). El término “síndrome de dificultad respiratoria del adulto” o “ARDS” también se refiere a una lesión pulmonar potencialmente mortal que permite que se filtre fluido a los pulmones, la respiración se vuelve difícil y no puede entrar oxígeno en el cuerpo tal como describe The American Lung Association (lung.org/lung-health-diseases). El término “síndrome de dificultad respiratoria del adulto” o “ARDS” también se refiere a una insuficiencia respiratoria caracterizada por la rápida aparición de inflamación extensa en los pulmones con signos y síntomas tales como dificultad respiratoria grave, respiración dificultosa e inusualmente rápida, tensión arterial baja, confusión y cansancio extremo, así como la presencia de cardiopatía o enfermedad pulmonar subyacente tal como se describe en el Mayo Clinic College of Medicine and Science (mayoclinic.org/patient-care-and-health-information). Las causas subyacentes más comunes de ARDS incluyen enfermedad infecciosa, septicemia, inhalación de sustancias dañinas, pancreatitis, traumatismo, neumonía, transfusiones masivas de sangre y quemaduras. La fisiopatología de ARDS resulta de la inflamación aguda en el espacio alveolar y la disminución del intercambio de gases normal. Se observa deposición de fibrina en los espacios aéreos y el parénquima pulmonar de manera consistente con ARDS y contribuye a la formación de la membrana hialina y la posterior fibrosis alveolar. Esto promueve el desarrollo y la progresión de la disfunción respiratoria y la insuficiencia cardíaca derecha (Whyte CS, Morrow GB, Mitchell JL, Chowdar y P, Mutch NJ. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19. J Thromb Haemost. 23 de abril de 2020. doi: 10.1111/jth.14872). El término “síndrome de dificultad respiratoria del adulto” o “ARDS” también se refiere a ARDS relacionado con COVID-19 grave.

Como se usa en el presente documento, el término “síndrome de activación de macrófagos” o “MAS” tiene su significado general en la técnica y se refiere a una enfermedad caracterizada por pancitopenia, insuficiencia hepática, coagulopatía y síntomas neurológicos y se cree que está provocada por la activación y proliferación incontrolada de linfocitos T y macrófagos bien diferenciados, que conduce a hemofagocitosis extendida y sobreproducción de citocinas. El término “síndrome de activación de macrófagos” o “MAS” también se refiere a una complicación potencialmente mortal de la enfermedad reumática que se produce mucho más frecuentemente en individuos con artritis idiopática juvenil sistémica (SJIA) y en aquellos con enfermedad de Still de aparición en adultos (Crayne *et al.*, The Immunology of Macrophage Activation Syndrome. Front Immunol. 1 de febrero de 2019; 10:119. doi:10.3389/fimmu.2019.00119; Lerkvaleekul y Vilaiyuk. Macrophage activation syndrome: early diagnosis is key. Open Access Rheumatol. 31 de agosto de 2018; 10: 117-128. doi: 10.2147/OARRR.S151013). El término “síndrome de activación de macrófagos” también se refiere a MAS relacionado con COVID-19 grave (Merad y Martin. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. Nat. Immunol. 6 de mayo de 2020 doi: 10.1038/s41577-020-0331-4).

Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro” tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades inflamatorias relacionadas con la disfunción en la homeostasis del hierro. En algunas realizaciones, la expresión “enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro” se refiere a enfermedades inflamatorias relacionadas con síndromes de sobrecarga de hierro. La expresión “enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro” también se refiere a la respuesta inflamatoria grave relacionada con el hierro, particularmente la respuesta inflamatoria grave relacionada con el hierro en pacientes con COVID-19.

Como se usa en el presente documento, el término “respuestas inflamatorias alveolares” tiene su significado general en la técnica y se refiere a enfermedades inflamatorias relacionadas con la disfunción de la función de macrófagos alveolares, tal como después de traumatismo torácico, isquemia/reperfusión, choque hemorrágico y quemaduras térmicas. El término “respuestas inflamatorias alveolares” también se refiere a enfermedades inflamatorias relacionadas con la expresión aumentada de genes de quimiocinas en macrófagos alveolares asociados con lesión pulmonar aguda (LPA) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) (Niesler *et al.*, Role of alveolar macrophages in the inflammatory response after trauma. Shock. Julio de 2014; 42(1):3-10. doi: 10.1097/SHK.000000000000167). El término “respuestas inflamatorias alveolares” también se refiere a respuestas inflamatorias alveolares relacionadas con COVID-19.

Como se usa en el presente documento, el término “COVID-19” o “enfermedad de coronavirus de 2019” tiene su significado general en la técnica y se refiere a una enfermedad de coronavirus infecciosa provocada por coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2), un coronavirus recién identificado en diciembre de 2019 en Wuhan, China. El término “COVID-19” también se refiere a la enfermedad respiratoria aguda de 2019-nCoV. COVID-19 da como resultado una enfermedad respiratoria de leve a moderada, pero en algunos casos puede convertirse en COVID-19 grave.

Como se usa en el presente documento, el término “COVID-19 grave” tiene su significado general en la técnica y se refiere al efecto secundario de COVID-19 que da como resultado enfermedad respiratoria grave, neumonía, septicemia viral, síndrome de liberación de citocinas (CRS), síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS), síndrome de activación de macrófagos (MAS), síndrome de insuficiencia multivisceral provocado por una respuesta inflamatoria potenciada tal como insuficiencia renal y pulmonar, insuficiencia respiratoria, inflamación arterial, miocarditis (también conocida como miocardiopatía inflamatoria), lesión miocárdica, trombosis, evento tromboembólico venoso,

enfermedades cardiovasculares tales como las descritas en Han Y, Zeng H, Jiang H, Yang Y, Yuan Z, Cheng X, Jing Z, Liu B, Chen J, Nie S, Zhu J, Li F, Ma C. CSC Expert Consensus on Principles of Clinical Management of Patients with Severe Emergent Cardiovascular Diseases during the COVID-19 Epidemic. *Circulation*. 27 de marzo de 2020. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047011), embolia pulmonar, toxicidades neurológicas, enfermedad de Kawasaki (también conocida como síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos) y manifestaciones cutáneas de COVID-19 tal como se describe en (Sachdeva M, Gianotti R, Shah M, Lucia B, Tosi D, Veraldi S, Ziv M, Leshem E, Dodiuk-Gad RP. Cutaneous manifestations of COVID-19: Report of three cases and a review of literature. *J Dermatol Sci*. 29 de abril de 2020. pii: S0923-1811(20)30149-3. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.04.011).

El término "CD44" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una molécula de glucoproteína transmembrana CD44 (grupo sanguíneo indio) implicada en interacciones célula-célula, adhesión celular y migración. El término "CD44", como se usa en el presente documento, pretende designar una glicoproteína transmembrana, un receptor de membrana plasmática de ácido hialurónico (HA o Hyal) implicado en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos que incluyen desarrollo, inflamación, respuestas inmunitarias, cicatrización de heridas, regulación de transiciones epitelio-mesenquimatosas (EMT) y progresión del cáncer (Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A. CD44: from adhesión molecules to signalling regulators. *Nat. Mol. Cell Biol.* 4, 33-45, (2003); Zöller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254-267, (2011)). El término "CD44" también se refiere a la glucoproteína de superficie celular, cuyas isoformas tienen el identificador de GeneCards GC11P035139 y el identificador de la base de datos UniProt Knowledge UniProtKB/Swiss-Prot P16070 (Stelzer *et al.*, The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*. 20 de junio de 2016; 54:1.30.1-1.30.33. doi: 10.1002/cpbi.5; Consorcio UniProt. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 8 de enero de 2019;47(D1):D506-D515. doi: 10.1093/nar/gky1049). CD44 interactúa con y media en la endocitosis de hialuronatos (Hyal), una clase de biopolímeros de glucosaminoglucanos (Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313, (1990); Hua, Q., Knudson, C. B. & Knudson, W. Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Sci.* 106, 365-375, (1993)).

El término "ácido hialurónico" o "HA" o "Hyal" tiene su significado general en la técnica y se refiere a ácido hialurónico (HA) también conocido como hialuronato (Hyal) y hialuronano. El término "ácido hialurónico" o "HA", como se usa en el presente documento, pretende designar una clase de biopolímeros de glucosaminoglucano implicados en una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo proliferación celular, migración celular, transiciones epitelio-mesenquimatosas (TEM) y progresión del cáncer (Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B. & Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 61, 1303-1313, (1990); Hua, Q., Knudson, C. B. & Knudson, W. Internalization of hyaluronan by chondrocytes occurs via receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Sci.* 106, 365-375, (1993)).

Como se usa en el presente documento, el término "antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA)" se refiere a cualquier compuesto seleccionado del grupo que consiste en, pero sin limitación, compuestos que se dirigen a la homeostasis del hierro, compuestos que se dirigen a CD44 seleccionados del grupo que consiste en antagonista de CD44 o inhibidor de la expresión de CD44, compuestos que se dirigen a ácido hialurónico (HA), inhibidores de la internalización de ácido hialurónico (HA)/hierro, inhibidores de la endocitosis del hierro, quelantes de hierro tales como deferoxamina (DFO); mesilato de deferoxamina; clorhidrato de deferoxamina; deferasirox (DFX); deferiprona (DFP); deferitrina; deferipona; metformina; metforminina; deferitazol; fragmentos de hepcidina; y sideróforos. El antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) tiene su efecto terapéutico antagonizando la señalización de IL6.

El término "antagonista de CD44" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un compuesto que inactiva selectivamente la CD44. El término "antagonista de CD44" se refiere a cualquier compuesto que puede inhibir directa o indirectamente la cascada de transducción de señales relacionada con CD44 e inhibe la unión al ligando de CD44 (ácido hialurónico (HA)), inhibe la unión del hierro al complejo de CD44/HA, inhibe la endocitosis del complejo de CD44/HA unido a hierro, inhibe la internalización de Hyal unido a hierro, y luego inhibe la desmetilación de las marcas de histona represivas H3K9me2 y H3K27me3, inhibe el agotamiento de H3K9me2 e inhibe la regulación por incremento de genes regulados por hierro (tales como el receptor de IL6 (IL6R/CD126)). Como se usa en el presente documento, el término "inactiva selectivamente" se refiere a un compuesto que inactiva preferentemente CD44 con una mayor afinidad y potencia, respectivamente, que su interacción con los otros subtipos o isoformas de la familia de receptores de señalización de CD44 y glucoproteína de la superficie celular. El antagonista de CD44 también se refiere a un compuesto que disminuye el nivel de actividad de CD44. Se contemplan compuestos que prefieren CD44, pero que también pueden inactivar otra familia de subtipos de receptores de señalización de CD44 y glicoproteínas de la superficie celular, como antagonistas parciales o completos. Normalmente, un antagonista de CD44 es una molécula orgánica pequeña, un polipéptido, un aptámero o un anticuerpo.

En la técnica se conocen bien antagonistas de CD44 como se describe en los documentos WO2008/144890; WO0139815; WO2004/018000; WO2005/049082; WO2008/079246; WO2014/023869; WO2005/087264.

El experto en la técnica conoce bien pruebas y ensayos para determinar si un compuesto es un antagonista de CD44 como se describe en los documentos WO2014/198843; WO2008/144890; WO2011/095498; WO2013/063498; WO2004/018000; WO2005/049082; WO2008/079246; WO2005/087264; WO2014/023869; WO2007/039761

"CRYSTAL STRUCTURE OF CD44 AND ITS USE"; Weigand *et al.*, J. Biol, 2012; D'Arena *et al.*, J. Biol, 2014.

En algunas realizaciones, el antagonista de CD44 es un anticuerpo anti-CD44 seleccionado de, pero sin limitación, el grupo que consiste en anticuerpo anti-CD44 RG7356; Bivatuzumab; y anticuerpos descritos en los documentos WO2008/144890; WO2004/018000; WO2005/049082; WO2008/079246; WO2005/087264.

- 5 En algunas realizaciones, el antagonista de CD44 es un péptido o un ligando de CD44 seleccionado de, pero sin limitación, el ligando descrito en el documento WO2015/097170.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención compiten por la unión a los anticuerpos frente a CD44 (y ácido hialurónico (HA)) descritos anteriormente.

- 10 En otra realización, el compuesto de la invención es un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en cuanto a reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden aislarse a través de la evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencias aleatorias puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringida presentada por una proteína plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli* que se seleccionan de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas *et al.*, 1996). Después de generar aptámeros dirigidos contra la diana de la invención como se ha descrito anteriormente, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente aquellos que bloquean o inactivan la diana.

En otra realización, el compuesto de la invención es un anticuerpo (incluyendo el término "porción de anticuerpo") dirigido contra la diana.

- 25 En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, la porción del anticuerpo comprende una cadena ligera del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, la porción del anticuerpo comprende una cadena pesada del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, la porción del anticuerpo comprende una porción Fab del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, la porción del anticuerpo comprende una porción F(ab')₂ del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, la porción del anticuerpo comprende una porción Fc del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, la porción del anticuerpo comprende una porción Fv del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, la porción del anticuerpo comprende un dominio variable del anticuerpo. En una realización de los anticuerpos o porciones de los mismos descritos en el presente documento, la porción del anticuerpo comprende uno o más dominios CDR del anticuerpo.

- 40 Como se usa en el presente documento, "anticuerpo" incluye anticuerpos tanto de origen natural como de origen no natural. Específicamente, "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales y monoclonales, y fragmentos monovalentes y divalentes de los mismos. Además, "anticuerpo" incluye anticuerpos quiméricos, anticuerpos completamente sintéticos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o no humano. Un anticuerpo no humano puede humanizarse mediante métodos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre.

- 45 Se preparan anticuerpos de acuerdo con la metodología convencional. Pueden generarse anticuerpos monoclonales usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la invención, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado a intervalos adecuados (por ejemplo, dos veces por semana, semanalmente, dos veces al mes o mensualmente) con formas antigénicas de la diana. Al animal puede administrarse un "refuerzo" final de antígeno en el plazo de una semana después del sacrificio. A menudo es deseable usar un adyuvante inmunológico durante la inmunización. Los adyuvantes inmunológicos adecuados incluyen adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, alumbre, adyuvante Ribi, Titermax de Hunter, adyuvantes de saponina tales como QS21 o Quil A, u oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen CpG. Otros adyuvantes adecuados se conocen bien en el campo. Los animales pueden inmunizarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intranasal u otras vías. Un animal dado puede inmunizarse con múltiples formas del antígeno por múltiples vías.

En resumen, el antígeno puede proporcionarse como péptidos sintéticos correspondientes a regiones antigénicas de interés en la diana. Después del régimen de inmunización, se aíslan linfocitos del bazo, ganglio linfático u otro órgano del animal y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada usando un agente tal como polietilenglicol para formar un hibridoma. Después de la fusión, las células se ponen en medios permisivos para el crecimiento de hibridomas pero no de las parejas de fusión usando métodos convencionales, como se describe (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3ª edición, Academic Press, Nueva York, 1996). Después del cultivo de los hibridomas, se analiza la presencia de anticuerpos de la especificidad deseada en los sobrenadantes celulares, es decir, que se unen selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación e inmunotransferencia de tipo Western. Otras técnicas de examen se conocen bien en el campo. Las técnicas preferidas son aquellas que confirman la unión de anticuerpos a antígeno plegado de manera nativa, conformacionalmente intacto, tales como ELISA no desnaturalizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación.

Significativamente, como se conoce bien en la técnica, sólo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el parátipo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W. R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 7ª ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', designado un fragmento F(ab')₂, retiene ambos sitios de unión a antígeno de un anticuerpo intacto. De manera similar, un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, designado un fragmento Fab, retiene uno de los sitios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Procediendo adicionalmente, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unida covalentemente y una porción de la cadena pesada de anticuerpo denominada Fd. Los fragmentos Fd son el determinante principal de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd puede asociarse con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítipo en aislamiento.

Dentro de la porción de unión a antígeno de un anticuerpo, como se conoce bien en la técnica, hay regiones determinantes de complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones marco (FR), que mantienen la estructura terciaria del parátipo (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de cadena pesada como en la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG, hay cuatro regiones marco (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente las CDR3 de cadena pesada, son en gran medida responsables de la especificidad del anticuerpo.

Está bien establecido ahora en la técnica que las regiones distintas de CDR de un anticuerpo de mamífero pueden reemplazarse con regiones similares de anticuerpos conoespecíficos o heteroespecíficos mientras se retiene la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta lo más claramente en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados" en los que CDR no humanas se unen covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas para producir un anticuerpo funcional.

Esta invención proporciona en ciertas realizaciones composiciones y métodos que incluyen formas humanizadas de anticuerpos. Como se usa en el presente documento, "humanizado" describe anticuerpos en donde algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se reemplazan por aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205, que se incorporan por el presente documento como referencia. Las anteriores patentes estadounidenses n.ºs 5.585.089 y 5.693.761 y el documento WO 90/07861 también proponen cuatro criterios posibles, que pueden usarse en el diseño de los anticuerpos humanizados. La primera propuesta fue que, para un aceptor, usar un armazón de una inmunoglobulina humana particular que es inusualmente homólogo a la inmunoglobulina donadora que va a humanizarse, o usar un armazón consenso de muchos anticuerpos humanos. La segunda propuesta fue que, si un aminoácido en el marco de la inmunoglobulina humana es inusual y el aminoácido donador en esa posición es típico de secuencias humanas, entonces puede seleccionarse el aminoácido donador en lugar del aceptor. La tercera propuesta fue que, en las posiciones inmediatamente adyacentes a las 3 CDR en la cadena de inmunoglobulina humanizada, puede seleccionarse el aminoácido donador en lugar del aminoácido aceptor. La cuarta propuesta fue usar el aminoácido donador que reside en las posiciones del marco en las que se predice que el aminoácido tiene un átomo de cadena lateral dentro de 3 Å de las CDR en un modelo tridimensional del anticuerpo y se predice que es capaz de interaccionar con las CDR. Los métodos anteriores son meramente ilustrativos de algunos de los métodos que un experto en la técnica podría emplear para fabricar anticuerpos humanizados. Un experto habitual en la técnica estará familiarizado con otros métodos para la humanización de anticuerpos.

En una realización de las formas humanizadas de los anticuerpos, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se han reemplazado con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana pero donde algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR permanecen sin cambios. Son permisibles pequeñas adiciones, delecciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no supriman la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Las moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluirían moléculas de IgG, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM. Un anticuerpo "humanizado" conserva una

especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original. Sin embargo, usando ciertos métodos de humanización, la afinidad y/o especificidad de unión del anticuerpo puede aumentarse usando métodos de "evolución dirigida", como describen Wu *et al.*, /. Mol. Biol. 294:151, 1999 cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia.

También pueden prepararse anticuerpos monoclonales completamente humanos inmunizando ratones transgénicos para grandes porciones de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584 y las referencias citadas en las mismas, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia. Estos animales se han modificado genéticamente de manera que hay una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican adicionalmente para que contengan la totalidad o una porción del locus génico de inmunoglobulina de línea germinal humana de manera que la inmunización de estos animales dará como resultado la producción de anticuerpos completamente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenMouse)), pueden prepararse anticuerpos monoclonales de acuerdo con la tecnología estándar de hibridoma. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (KAMA) cuando se administren a seres humanos.

También existen métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de presentación en fagos (patentes estadounidenses n.ºs 5.565.332 y 5.573.905) y estimulación *in vitro* de células B humanas (patentes estadounidenses n.ºs 5.229.275 y 5.567.610). El contenido de estas patentes se incorpora en el presente documento como referencia.

Por tanto, como resultará evidente para un experto en la técnica, la presente invención también proporciona fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmento F(ab')₂ quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos de fragmento Fab quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas; y anticuerpos de fragmentos Fd quiméricos en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han reemplazado por secuencias humanas o no humanas homólogas. La presente invención también incluye los denominados anticuerpos monocatenarios.

Las diversas moléculas y fragmentos de anticuerpos pueden derivarse de cualquiera de las clases de inmunoglobulinas comúnmente conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a IgA, IgA secretora, IgE, IgG e IgM. Las subclases de IgG también las conocen bien los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. En una realización preferida, el compuesto de la invención es una IgG4 humana.

En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo de dominio único. El término "anticuerpo de dominio único" (sdAb) o "VHH" se refiere al dominio variable de cadena pesada único de anticuerpos del tipo que puede encontrarse en mamíferos camélidos, que están desprovistos de manera natural de cadenas ligeras. Tales VHH también se denominan "Nanobody®". De acuerdo con la invención, sdAb puede ser particularmente sdAb de llama. El término "VHH" se refiere a la cadena pesada única que tiene 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR): CDR1, CDR2 y CDR3. El término "región determinante de complementariedad" o "CDR" se refiere a las secuencias de aminoácidos hipervariables que definen la afinidad de unión y especificidad del VHH.

El VHH de acuerdo con la invención puede prepararlo fácilmente un experto habitual en la técnica usando experimentación rutinaria. Las variantes de VHH y la forma modificada de las mismas pueden producirse bajo cualquier técnica conocida en la técnica tal como maduración *in vitro*.

Los VHH o sdAb se generan habitualmente mediante clonación por PCR del repertorio de dominios V a partir de ADNc de sangre, ganglio linfático o bazo obtenido de animales inmunizados en un vector de presentación en fago, tal como pHEN2. Los VHH específicos de antígeno se seleccionan comúnmente mediante cribado de bibliotecas de fagos sobre antígeno inmovilizado, por ejemplo, antígeno recubierto sobre la superficie de plástico de un tubo de ensayo, antígenos biotinilados inmovilizados sobre perlas de estreptavidina, o proteínas de membrana expresadas sobre la superficie de células. Sin embargo, tales VHH a menudo muestran menores afinidades por su antígeno que los VHH derivados de animales que han recibido varias inmunizaciones. La alta afinidad de los VHH de bibliotecas inmunitarias se atribuye a la selección natural de los VHH variantes durante la expansión clonal de las células B en los órganos linfoides de animales inmunizados. La afinidad de los VHH de bibliotecas no inmunitarias a menudo puede mejorarse imitando esta estrategia *in vitro*, es decir, mediante mutagénesis dirigida al sitio de las regiones CDR y rondas adicionales de cribado sobre el antígeno inmovilizado en condiciones de rigurosidad aumentada (temperatura más alta, concentración salina alta o baja, pH alto o bajo y bajas concentraciones de antígeno). Los VHH derivados de camélido se expresan fácilmente en y se purifican a partir del periplasma de *E. coli* a niveles mucho mayores que los dominios correspondientes de anticuerpos convencionales. Los VHH generalmente muestran alta solubilidad y estabilidad y también pueden producirse fácilmente en células de levadura, plantas y mamíferos. Por ejemplo, las "patentes de Hamers" describen métodos y técnicas para generar VHH contra cualquier diana deseada (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.800.988; US 5.874.541 y US 6.015.695). Las "patentes de Hamers" describen más particularmente la producción de VHH en huéspedes bacterianos tales como *E. coli* (véase por ejemplo el documento US 6.765.087)

y en huéspedes eucariotas inferiores tales como mohos (por ejemplo *Aspergillus* o *Trichoderma*) o en levaduras (por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase por ejemplo el documento US 6.838.254).

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite por la unión a la diana con el anticuerpo de la invención.

5 Como se usa en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno o epítipo predeterminado normalmente es una unión con una afinidad correspondiente a una KD de aproximadamente 10⁻⁷ M o menos, tal como aproximadamente 10⁻⁸ M o menos, tal como aproximadamente 10⁻⁹ M o menos, aproximadamente 10⁻¹⁰ M o menos, o aproximadamente 10⁻¹¹ M o incluso menos cuando se determina, por ejemplo, mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 usando una forma soluble del antígeno como ligando y el anticuerpo como analito. BIAcore® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) es uno de una variedad de formatos de ensayo de resonancia de plasmón superficial que se usan rutinariamente para paneles de contenedores de epítopos de anticuerpos monoclonales. Normalmente, un anticuerpo se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo al menos 100.000 veces menor que su KD para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína), que no es idéntico ni está estrechamente relacionado con el antígeno predeterminado. Cuando la KD del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo tiene una alta afinidad), entonces la KD con la que se une al antígeno es normalmente al menos 10.000 veces menor que su KD para un antígeno no específico. Se dice que un anticuerpo esencialmente no se une a un antígeno o epítipo si tal unión no es detectable (usando, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 usando una forma soluble del antígeno como ligando y el anticuerpo como analito), o es 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces menor que la unión detectada por ese anticuerpo y un antígeno o epítipo que tiene una estructura química o secuencia de aminoácidos diferente.

Pueden identificarse anticuerpos adicionales basándose en su capacidad para competir de manera cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención en ensayos de unión a antígeno convencionales. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de anticuerpos de la presente invención a la diana demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo por la unión a la diana; tal anticuerpo puede, de acuerdo con la teoría no limitante, unirse al mismo epítipo o a un epítipo relacionado (por ejemplo, estructuralmente similar o espacialmente proximal) en la diana que el anticuerpo con el que compite. Por tanto, otro aspecto de la invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo antígeno que, y compiten con, los anticuerpos divulgados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo "compite" por la unión cuando el anticuerpo competitivo inhibe la unión a la diana de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención en más del 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % en presencia de una concentración equimolar de anticuerpo competitivo.

35 En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la invención se unen a uno o más epítopos de la diana. En algunas realizaciones, los epítopos a los que se unen los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son epítopos lineales. En otras realizaciones, los epítopos a los que se unen los presentes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno son epítopos conformacionales no lineales.

40 En una realización, el antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) de la invención es un inhibidor de la expresión de CD44.

El término "expresión", cuando se usa en el contexto de la expresión de un gen o ácido nucleico, se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto génico. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen ARN mensajeros, que se modifican, mediante procesos tales como protección terminal, poliadenilación, metilación y edición, y proteínas modificadas mediante, por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación, miristilación y glicosilación.

Un "inhibidor de la expresión" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de un gen. Un "inhibidor de la expresión" se refiere a cualquier compuesto que tiene un efecto biológico inhibiendo la expresión de un gen diana y/o la expresión de la proteína diana. En una realización de la invención, dicho inhibidor de la expresión es un ARN de horquilla corto (ARNhc), un ARN inhibidor pequeño (ARNip) o un oligonucleótido antisentido. Preferentemente, el inhibidor de la expresión es un ARNip o un ARNhc.

Los inhibidores de la expresión de la diana para su uso en la presente invención pueden basarse en constructos de oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido, incluyendo moléculas de ARN antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarían bloqueando directamente la traducción del ARNm diana uniéndose al mismo y evitando así la traducción de proteínas o aumentando la degradación del ARNm, disminuyendo así el nivel de las proteínas diana, y por tanto la actividad, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia de transcrito de ARNm que codifica la diana, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse mediante, por ejemplo,

inyección o infusión intravenosa. En la técnica se conocen bien métodos para usar técnicas antisentido para aliviar específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732).

Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de la diana para su uso en la presente invención. La expresión del gen diana puede reducirse poniendo en contacto el sujeto o la célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbc), o un vector o constructo que provoca la producción de un ARN bicatenario pequeño, de modo que la expresión de la diana se inhiba específicamente (es decir, interferencia de ARN o iARN). En la técnica se conocen bien métodos para seleccionar un ARNbc o vector que codifica ARNbc apropiado para genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véanse Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S. M. *et al.* (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. *et al.* (2002); Brummelkamp, TR. *et al.* (2002); patentes estadounidenses n.ºs 6.573.099 y 6.506.559; y publicaciones de patente internacional n.ºs WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836).

El ARN de horquilla corto (ARNhc) o los ARN inhibidores pequeños (ARNip) pueden funcionar como inhibidores de la expresión génica para su uso en la invención. La expresión génica puede reducirse con un ARN bicatenario pequeño (ARNbc), o un vector o constructo que provoca la producción de un ARN bicatenario pequeño, de modo que la expresión génica se inhiba específicamente (es decir, interferencia de ARN o iARN). En la técnica se conocen bien métodos para seleccionar un ARNbc o vector que codifica ARNbc apropiado para genes cuya secuencia se conoce.

Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión de la diana para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima con motivo de horquilla o cabeza de martillo modificadas por ingeniería genética que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de las secuencias de ARNm diana son útiles de ese modo dentro del alcance de la presente invención. Los sitios de escisión de ribozima específicos dentro de cualquier posible diana de ARN se identifican inicialmente explorando la molécula diana para detectar sitios de escisión de ribozima, que incluyen normalmente las siguientes secuencias, GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, pueden evaluarse secuencias de ARN cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión para determinar características estructurales predichas, tales como estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de oligonucleótido sea inadecuada. La idoneidad de las dianas candidatas también puede evaluarse sometiendo a prueba su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasas.

Tanto los oligonucleótidos antisentido (ODN) como las ribozimas útiles como inhibidores de la diana pueden prepararse mediante métodos conocidos. Estas incluyen técnicas para la síntesis química tales como, por ejemplo, mediante síntesis química de fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, pueden generarse moléculas de ARN antisentido mediante transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Pueden introducirse diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la invención como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de uniones de fosfodiéster dentro de la cadena principal del oligonucleótido.

Los oligonucleótidos antisentido, los ARNip y las ribozimas de la invención pueden administrarse *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del ARNip oligonucleotídico antisentido o ácido nucleico de ribozima a las células y preferiblemente a las células que expresan la diana. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida con respecto al grado de degradación que daría como resultado la ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante inserción o incorporación del ARNip oligonucleotídico antisentido o secuencias de ácido nucleico de ribozima. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como virus de la leucemia murina de Moloney, virus de sarcoma murino de Harvey, virus de tumor mamario murino y virus de sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociado; virus de tipo SV40; virus de polio; virus de Epstein-Barr; virus de papiloma; virus de herpes; virus vaccinia; virus de la polio; y virus de ARN tal como un retrovirus. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

Los vectores víricos preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los que se han sustituido genes no esenciales por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo vital implica la transcripción inversa del ARN genómico viral en el ADN con la posterior integración proviral en el ADN celular del huésped. Los retrovirus se han aprobado para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que son de replicación deficiente (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovirales alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción de genes *in vivo* de alta eficacia. Se proporcionan protocolos estándar para producir retrovirus de replicación deficiente (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en

un plásmido, transfección de una célula de empaquetamiento revestida con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recogida de partículas víricas de medios de cultivo tisular e infección de las células diana con partículas víricas) en KRIEGLER (A Laboratory Manual, W.H. Freeman C.O., Nueva York, 1990) y en MURRY (Methods in Molecular Biology, vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991).

5 Virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y virus adenoasociados, que son virus de ADN bicatenario que ya se han aprobado para uso humano en terapia génica. El virus adenoasociado puede modificarse por ingeniería genética para que sea de replicación deficiente y sea capaz de infectar una amplia gama de tipos y especies celulares. Además, tiene ventajas tales como estabilidad frente al calor y a los disolventes lipídicos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluidas células hematopoyéticas; y ausencia de inhibición por superinfección, permitiendo así múltiples series de transducciones. Según se informa, el virus adenoasociado puede integrarse en el ADN celular humano de una manera específica de sitio, minimizando de ese modo la posibilidad de mutagénesis insercional y la variabilidad de la expresión génica insertada característica de la infección retroviral. Además, se han seguido infecciones por virus adenoasociados de tipo silvestre en cultivo de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de una manera extracromosómica.

20 Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y los conocen bien los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, SANBROOK *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, se han usado vectores plasmídicos como vacunas de ADN para administrar genes que codifican antígenos a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que muchos de los vectores víricos. Sin embargo, estos plásmidos, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos los conocen bien los expertos en la técnica. Adicionalmente, los plásmidos pueden diseñarse a medida usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden administrarse por una variedad de vías parenterales, mucosas y tópicas. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También puede administrarse por pulverizaciones o gotas intranasales, supositorios rectales y por vía oral. También puede administrarse en la epidermis o una superficie mucosa usando una pistola génica. Los plásmidos pueden administrarse en una solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN incluyendo pero sin limitarse a liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

En algunas realizaciones, el inhibidor de la expresión de CD44 es un ácido nucleico que inhibe genes de CD44 tal como se describe en el documento CN104561000.

En otro aspecto de la divulgación, el antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) de la invención es un quelante de hierro.

Como se usa en el presente documento, el término "quelante de hierro" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier compuesto que quela hierro y después agota el nivel celular de hierro. El término "quelante de hierro" también se refiere a compuestos que eliminan el exceso de hierro, hierro tóxico de la sangre, tejidos y órganos del paciente.

40 En la técnica se conocen bien quelantes de hierro como se describe en los documentos WO0149266; WO2009103727; WO2011109521; WO2014059417; WO2017153475; WO2019233982 y en Lima *et al.*, Treatment of iron overload syndrome: a general review. Rev Assoc Med Bras (1992). 10 de octubre de 2019; 65(9):1216-1222. doi:10.1590/1806-9282.65.9.1216; Mobarra *et al.*, A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. 1 de octubre de 2016; 10(4):239-247; Khan *et al.*, Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. Microbiol Res. Julio-agosto de 2018;212-213:103-111. doi: 10.1016/j.micres.2017.10.012; Khan *et al.*, Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. Microbiol Res. Julio-agosto de 2018;212-213:103-111. doi: 10.1016/j.micres.2017.10.012; Kontoghiorghe GJ. Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs. Toxicol Lett. Octubre de 1995; 80(1-3):1-18.

50 Los expertos en la técnica conocen bien pruebas y ensayos para determinar si un compuesto es un quelante de hierro tal como se describe en los documentos WO0149266; WO2009103727; WO2011109521; WO2014059417; WO2017153475; WO2019233982.

55 En algunos aspectos, el quelante de hierro se selecciona de, pero sin limitación, el grupo que consiste en deferoxamina (DFO) (también conocida como desferal, desferrioxamina, DFB, número CAS: 70-51-9); mesilato de deferoxamina (número CAS: 138-14-7); clorhidrato deferoxamina (número CAS: 1950-39-6); deferasiro (DFX); deferiprona (DFP); deferitrina; deferipona; metformina; metforminina; deferitazol; 3-hidroxi-4-piridinona; derivados de 3-hidroxi-4-piridinona; hepcidina y fragmentos de hepcidina (mini-hepcidinas); poliamina-ácido dihidroxibenzoico y conjugado de poliamina-ácido dihidroxibenzoico; piridoxal isonicotinoil hidrazona (PIH); ácido rodotorúlico; ácido N,N'-bis(2-hidroxibencil)etilendiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido N,N'-bis(2-hidroxibencil)propilen-1,3-diamina-N,N'-diacético (HBPDP), ácido 2,3-dihidroxibenzoico; ácido dietiltriiminapentaacético (DTPA) y compuestos descritos en la patente

estadounidense n.º US5374771; las solicitudes de patente internacional números WO0149266; WO2009103727; WO2011109521; WO2014059417; WO2017153475; WO2019233982; y en Lima *et al.*, Treatment of iron overload syndrome: a general review. Rev Assoc Med Bras (1992). 10 de octubre de 2019; 65(9):1216-1222. doi:10.1590/1806-9282.65.9.1216; Kontoghiorghe GJ. Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs. Toxicol Lett. Octubre de 1995; 80(1-3):1-18.

En algunos aspectos, el quelante de hierro es un derivado de biguanida seleccionado de, pero sin limitación, el grupo que consiste en metformina, derivados de metformina tales como metformina y compuestos que comprenden el radical biguanidilo descritos en el documento WO2019233982.

En algunos aspectos, el quelante de hierro se selecciona de, pero sin limitación, el grupo que consiste en quelantes de hierro producidos por sideróforos y sideróforos bacterianos (catecolato, hidroxamato, carboxilato o tipos mixtos) tales como desferrioxamina; sideróforo catecolato: enterobactina; vibrioferrina; sideróforo mixto: yersiniabactina; y fitosideróforo: ácido mugínico; y quelantes de hierro descritos en (Khan *et al.*, Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. Microbiol Res. Julio-agosto de 2018;212-213:103-111. doi: 10.1016/j.micres.2017.10.012).

En algunos aspectos, el quelante de hierro es la ferromicina de molécula pequeña que secuestra hierro lisosómico.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para tratar el síndrome de liberación de citocinas (CRS) en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA).

En algunas realizaciones, la invención se refiere a un método para tratar CRS relacionado con COVID-19 grave en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para tratar el síndrome de dificultad respiratoria (ARDS), el síndrome de activación de macrófagos (MAS), enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y/o respuestas inflamatorias alveolares en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para tratar COVID-19, particularmente COVID-19 grave en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA).

En algunas realizaciones, el antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) de la invención se administra en combinación con el tratamiento contra el síndrome de liberación de citocinas (CRS).

En algunas realizaciones, el antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) de la invención se administra en combinación con el tratamiento contra CRS relacionado con COVID-19 grave.

En algunas realizaciones, el antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) de la invención se administra en combinación con cualquier compuesto adicional que se usa en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (ARDS), síndrome de activación de macrófagos (MAS), enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y/o respuestas inflamatorias alveolares.

En algunas realizaciones, el antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) de la invención se administra en combinación con el tratamiento contra COVID-19, particularmente el tratamiento contra COVID-19 grave.

En particular, el antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) de la invención puede administrarse en combinación con agentes antiinflamatorios.

La expresión "tratamiento contra el síndrome de liberación de citocinas (CRS)" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier compuesto que se usa en el tratamiento de CRS y cualquier tipo de terapia contra CRS que experimentan los sujetos con CRS, incluido cualquier compuesto que se usa en el tratamiento de CRS (Shimabukuro-Vornhagen *et al.*, Cytokine release syndrome. J Immunother Cancer. 15 de junio de 2018; 6(1):56. doi: 10.1186/s40425-018-0343-9; Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. Science. 1 de mayo de 2020; 368(6490): 473-474. doi: 10.1126/science.abb8925).

Los compuestos y terapias usados en el tratamiento de CRS incluyen, pero no se limitan a antihistamínicos; antipiréticos; fluidos orales o intravenosos usados en terapia de rehidratación; terapia antibiótica; BiTE blinatumomab; antagonistas de IL6 tales como agentes dirigidos a IL6 tales como Siltuximab o agentes dirigidos a IL6R tales como tocilizumab y sarilumab; agentes anti-TNF α tales como etanercept; agentes anti-GM-CSF tales como Lenzilumab; ibrutinib; y terapias de anticuerpos que agotan células T tales como alemtuzumab y globulina antitimocito (ATG), inhibidores basados en IL-1R (anakinra) y ciclofosfamida; y agentes antiinflamatorios.

El término "tratamiento contra COVID-19" tiene su significado general en la técnica y se refiere a cualquier tipo de terapia contra COVID-19 experimentada por los sujetos con COVID-19, incluido cualquier compuesto que se usa en el tratamiento de COVID-19, tal como agentes antivirales, compuestos usados en el tratamiento de CRS relacionado con COVID-19 grave y agentes antiinflamatorios (Zhou *et al.*, M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. Front Med. Abril de 2020; 14(2): 126-135. doi: 10.1007/s11684-020-0767-8).

Los compuestos y terapias usados en el tratamiento de COVID-19 incluyen, pero no se limitan a agentes antivirales tales como remdesivir (GS-5734), GS-441524, lopinavir, ritonavir, combinación de lopinavir/ritonavir (LPV/r), combinación de lopinavir/ritonavir e interferón beta 1-alfa (combinación de LPV/r/INF-β-1a), ribavirina, combinación de ribavirina e interferón-α (combinación de ribavirina e INF-α2b) y abidol (umifenovir o Arbidol); antagonistas de IL6 tales como agentes dirigidos a IL6 tales como Siltuximab, o agentes dirigidos a IL6R tales como tocilizumab, sarilumab; antagonistas de IL-1 tales como antagonistas de IL-1 β anakinra; bloqueantes de TNF; inhibidores de IFN-αβ; cloroquina; hidroxiclороquina (HCQ); corticosteroides; agentes antimicrobianos tales como antibióticos y agentes antifúngicos; inmunoglobulina intravenosa (IGIV); terapia plasmática convaleciente; agentes anticoagulantes; terapia con oxígeno tal como terapia con oxígeno de cánula nasal de flujo elevado (HFNC), ventilación mecánica no invasiva (NIV), ventilación mecánica invasiva y oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO); terapia de sustitución renal continua (CRRT); y compuestos usados en el tratamiento de CRS.

Los agentes antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como indometacina, ibuprofeno, acetato de ácido salicílico, sulindaco, piroxicam y naproxeno; y corticosteroides.

Composición farmacéutica

Los compuestos de la invención pueden usarse o prepararse en una composición farmacéutica.

En una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS) en un sujeto que lo necesita.

En algunas realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de CRS relacionado con COVID-19 grave en un sujeto que lo necesita.

Normalmente, el compuesto de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Normalmente, los compuestos de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente se administran al paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto de la presente invención como se ha descrito anteriormente, quiere decirse una cantidad suficiente del compuesto a una razón beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente invención lo decidirá el médico encargado dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, 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 coincidentes con el compuesto específico empleado; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Normalmente, 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 compuesto de la presente invención para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que va a tratarse. Un medicamento contiene normalmente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del compuesto de la presente invención, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del compuesto de la presente invención. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

En una realización particular, el compuesto de acuerdo con la invención puede usarse en una concentración de entre 0,01 μM y 20 μM, particularmente, el compuesto de la invención puede usarse en una concentración de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 μM.

De acuerdo con la invención, el compuesto de la presente invención se administra al sujeto en forma de una composición farmacéutica. Normalmente, el compuesto de la presente invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se

refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar sólida, semisólida o líquida no tóxica de cualquier tipo.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local 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, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y rectal.

Normalmente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos, que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de inyectarse. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, de potasio, de calcio o de magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, tras la adición, según el caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuate 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 debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Pueden prepararse soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. El compuesto de la presente invención puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (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, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse 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. El portador también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse 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 de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos agentes esterilizados de la presente invención en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos típicos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del compuesto de la presente invención más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución del mismo previamente esterilizada por filtración. También se contempla la preparación de soluciones más o altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé que el uso de DMSO como disolvente dé como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando altas concentraciones de los agentes activos a una pequeña área tumoral. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido en primer lugar se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse los conocerán los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación. Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que esté tratándose. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir cualquier compuesto adicional que se use en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS).

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir cualquier compuesto adicional que se use en el tratamiento de CRS relacionado con COVID-19 grave.

5 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir cualquier compuesto adicional que se use en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (ARDS), síndrome de activación de macrófagos (MAS), enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y/o respuestas inflamatorias alveolares.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir cualquier compuesto adicional que se use en el tratamiento de COVID-19, particularmente COVID-19 grave.

En una realización, dichos compuestos activos adicionales pueden estar contenidos en la misma composición o administrarse por separado.

10 En otra realización, la composición farmacéutica de la invención se refiere a una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas (CRS) en un sujeto que lo necesita.

15 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención se refiere a una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de CRS relacionado con COVID-19 grave en un sujeto que lo necesita.

En otra realización, la composición farmacéutica de la invención se refiere a una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (ARDS), síndrome de activación de macrófagos (MAS), enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y/o respuestas inflamatorias alveolares.

20 En otra realización, la composición farmacéutica de la invención se refiere a una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de COVID-19, particularmente COVID-19 grave.

La invención también proporciona kits que comprenden el compuesto de la invención. Los kits que contienen el compuesto de la invención encuentran uso en métodos terapéuticos.

Método de diagnóstico

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de CD44 como biomarcador de predisposición a COVID-19 grave, y a continuación predecir la aparición de COVID-19 grave.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar COVID-19 grave, que comprende una etapa de medir en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto el nivel de expresión de CD44.

30 Como se usa en el presente documento, el término "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra biológica derivada del sujeto, tal como muestra de sangre, muestra de sangre periférica, muestra broncoalveolar, muestra bronquial, muestra alveolar, muestra nasofaríngea, muestra de esputo, muestra de moco, muestra de tráquea o muestra nasal.

35 El método de la invención puede comprender además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de CD44 en la muestra biológica con un valor de referencia, en el que la detección diferencial en el nivel de expresión de CD44 entre la muestra biológica y el valor de referencia es indicativa de que el sujeto tiene o está en riesgo de tener o desarrollar COVID-19 grave.

40 Como se usa en el presente documento, el "valor de referencia" se refiere a un valor umbral o un valor de corte. Normalmente, un "valor umbral" o "valor de corte" puede determinarse de manera experimental, empírica o teórica. También puede seleccionarse arbitrariamente un valor umbral basándose en las afecciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería un experto habitual en la técnica. El valor umbral tiene que determinarse para obtener la sensibilidad y especificidad óptimas según la función de la prueba y el equilibrio de beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de falsos positivos y falsos negativos). Normalmente, la sensibilidad y especificidad óptimas (y por tanto el valor umbral) pueden determinarse usando una curva de Características Operativas del Receptor (ROC) basada en datos experimentales. Preferiblemente, el experto en la técnica puede comparar el nivel de expresión (obtenido según el método de la invención) con un valor umbral definido. En una realización de la presente invención, el valor umbral se deriva del nivel de expresión (o razón, o puntuación) determinado en una muestra biológica derivada de uno o más sujetos que tienen COVID-19 grave. Además, la medición retrospectiva del nivel de expresión (o razón, o puntuaciones) en muestras históricas de sujetos debidamente almacenadas puede usarse para establecer estos valores umbral.

50 En una realización, el valor de referencia puede corresponder al nivel de expresión de CD44 determinado en una muestra biológica asociada con un sujeto que no tiene o no está en riesgo de tener o desarrollar COVID-19 grave. Por consiguiente, un nivel de expresión de CD44 más alto que el valor de referencia es indicativo de que un sujeto tiene o está en riesgo de tener o desarrollar COVID-19 grave, y un nivel de expresión de CD44 más bajo o igual que el valor

de referencia es indicativo de un sujeto que no tiene o no está en riesgo de tener o desarrollar COVID-19 grave.

En otra realización, el valor de referencia puede corresponder al nivel de expresión de CD44 determinado en una muestra biológica asociada con un sujeto que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar COVID-19 grave. Por consiguiente, un nivel de expresión mayor o igual de CD44 que el valor de referencia es indicativo de un sujeto que

El análisis del nivel de expresión de CD44 puede evaluarse mediante cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos para detectar la expresión de un ácido nucleico transcrito o proteína traducida.

En una realización, el nivel de expresión de CD44 se evalúa analizando la expresión del transcrito de ARNm o precursores de ARNm, tal como ARN naciente, del gen de CD44. Dicho análisis puede evaluarse preparando ARNm/ADNc a partir de células en una muestra biológica de un sujeto, e hibridando el ARNm/ADNc con un polinucleótido de referencia. El ARNm/ADNc preparado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis de tipo Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa, tales como PCR cuantitativa (TaqMan), y matrices de sondas tales como matrices de ADN GeneChip(TM) (AFFYMETRIX).

Ventajosamente, el análisis del nivel de expresión del ARNm transcrito a partir del gen que codifica CD44 implica el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental expuesta en la patente estadounidense n.º 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany, 1991), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli *et al.*, 1990), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh *et al.*, 1989), Q-Beta Replicasa (Lizardi *et al.*, 1988), replicación de círculo rodante (patente estadounidense n.º 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. Como se usa en el presente documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden aparearse con regiones 5' o 3' de un gen (cadenas positiva y negativa, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entre las mismas. En general, los cebadores de amplificación tienen de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos de longitud y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

En otra realización, el nivel de expresión de CD44 se evalúa analizando la expresión de la proteína traducida a partir de dicho gen. Dicho análisis puede evaluarse usando un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo radiomarcado, marcado con cromóforo, marcado con fluoróforo o marcado con enzima), un derivado de anticuerpo (por ejemplo, un conjugado de anticuerpo con un sustrato o con la proteína o ligando de una proteína de un par de proteína/ligando (por ejemplo, biotina-estreptavidina)), o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monocatenario, un dominio hipervariable de anticuerpo aislado, etc.), que se une específicamente a la proteína traducida a partir del gen que codifica CD44.

Dicho análisis puede evaluarse mediante una variedad de técnicas bien conocidas por un experto en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de inmunotransferencia de tipo Western y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (RIA).

En un aspecto adicional, el método de la invención se realiza identificando la activación de macrófagos.

En una realización, la activación de macrófagos se evalúa midiendo el perfil de citocinas. El análisis de la activación de macrófagos puede evaluarse según el método de la invención.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para monitorizar la progresión de COVID-19 realizando el método de la invención.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar COVID-19 grave en un sujeto que lo necesita, que comprende las etapas de:

(i) identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar COVID-19 grave realizando el método según la invención, y

(ii) administrar a dicho sujeto un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) cuando se concluye que el sujeto tiene o está en riesgo de tener o desarrollar COVID-19 grave.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de CD44 como biomarcador de eficacia del compuesto de la invención, y a continuación predecir la respuesta de un sujeto al compuesto de la invención.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto que padece síndrome de liberación de citocinas (CRS) logrará una respuesta con un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) que comprende determinar el nivel de expresión de CD44, en el que dicho nivel de expresión se correlaciona con la respuesta del sujeto al tratamiento.

- 5 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto que padece COVID-19, particularmente COVID-19 grave, logrará una respuesta con un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA), que comprende determinar el nivel de expresión de CD44, en donde dicho nivel de expresión se correlaciona con la respuesta del sujeto al tratamiento.

- 10 En algunas realizaciones, el método comprende las etapas de i) determinar el nivel de expresión de CD44, ii) comparar el nivel de expresión determinado en la etapa i) con un valor de referencia predeterminado y iii) concluir que el sujeto logrará una respuesta cuando el nivel determinado en la etapa i) sea mayor que el valor de referencia predeterminado.

- 15 El método es por tanto particularmente adecuado para discriminar pacientes que responden de los que no responden. Como se usa en el presente documento, el término "paciente que responde" en el contexto de la presente divulgación se refiere a un sujeto que logrará una respuesta, es decir, un sujeto en el que la enfermedad se erradica, reduce o mejora. De acuerdo con la invención, los pacientes que responden tienen una respuesta objetiva y, por lo tanto, el término no abarca sujetos que tienen una enfermedad estabilizada de manera que la enfermedad no progresa después de la terapia. Un sujeto que no responde o refractario incluye sujetos para los que la enfermedad no muestra reducción o mejora después de la terapia. De acuerdo con la invención, el término "paciente que no responde" también incluye sujetos que tienen una enfermedad estabilizada. Normalmente, la caracterización del sujeto como que responde o que no responde puede realizarse por referencia a un patrón o un conjunto de entrenamiento. El patrón puede ser el perfil de un sujeto que se sabe que es un paciente que responde o que no responde o, alternativamente, puede ser un valor numérico. Tales patrones predeterminados pueden proporcionarse en cualquier forma adecuada, tal como una lista o diagrama impreso, programa de software informático u otros medios. Cuando se concluye que el sujeto es un paciente que no responde, el médico podría tomar la decisión de detener y cambiar la terapia para evitar cualquier efecto secundario adverso adicional.
- 25

En una realización, la presente invención se refiere a un método para tratar COVID-19 grave en un sujeto que lo necesita, que comprende las etapas de:

- (i) determinar si el sujeto logrará una respuesta con un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) realizando el método de acuerdo con la invención, y
- 30 (ii) administrar a dicho sujeto un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) cuando se concluye que el sujeto responde.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

- 35 **Figura 1:** Aumento de CD44 y RhoNOX-M en macrófagos activados. Se activaron monocitos tratados con GM-CSF (M1) con LPS (100 ng/ml) durante 24 horas y se activaron monocitos tratados con CSF1 con IL4 (20 ng/ml) durante 24 horas. Se midieron CD44, TfR y RhoNOX-M mediante citometría de flujo.

Figura 2: endocitosis de hierro dependiente de CD44 durante la activación macrofágica

- 40 **Figura 3:** Antagonistas de CD44 inducen niveles disminuidos de hierro celular en macrófagos derivados de monocitos activados. (A) ICP-MS de hierro y cobre celulares en macrófagos derivados de monocitos (MDM) activados (act.) tratados con siCtrl o siCD44. n=7 donantes. (B) Inmunotransferencia de tipo Western representativa de CD44 en MDM act. transfectados con ARNip contra CD44 o ARNip de control. n = 4 donantes. Prueba de Mann-Whitney. Valores medios $\pm$ SEM. (C) ICP-MS de hierro y cobre celulares en MDM act. tratados con el anticuerpo anti-CD44 RG7356. n=7 donantes. Los diferentes donantes se indican en cada panel con puntos distintivos.

50 **Ejemplo:**

Ejemplo 1

Material y métodos

- Reactivos químicos y anticuerpos. Se obtuvieron GM-CSF e IFN-gamma de Miltenyi (Miltenyi Biotec, Somerville, MA, EE.UU.), deferroxamina (DFO) de Sigma-Aldrich (SIGMA-ALDRICH, Saint-Quentin Fallavier, Francia), RhoNox-M (interno), hialuronato de fluoresceína (FITC-Hyal) (#YH4532, Carbosynth, San Diego, CA, EE.UU.), transferrina de suero humano, conjugado de Alexa Fluor 647 (TF-647) (#T23366) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Se usaron anticuerpos contra CD44 (#ab189524 WB: 1:30000, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.), ferritina (#ab75973, WB: 1:1000, Abcam), H3K9me2 (#4658S, WB: 1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, EE.UU.), receptor de transferrina 1 (TfR1) (#13-6800, WB: 1:1000, Thermo Fisher Scientific).

- 5 Cultivo celular. Se recogieron muestras de sangre periférica de donantes sanos. Se clasificaron pan-monocitos usando microperlas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Somerville, MA, EE.UU.), se cultivaron en RPMI 1640 con glutamina (Thermo Fisher Scientific) complementado con suero bovino fetal al 10 % y se expusieron a 100 ng/ml de GM-CSF para generar su diferenciación. Después de 5 días de diferenciación, los macrófagos se activaron con IFN- γ (50 ng/ml) y se trataron por DFO (10 μ m) durante 24 horas.
- 10 Lavados broncoalveolares (BAL). Se centrifugó BAL de pacientes con COVID, luego se purificaron macrófagos alveolares por adherencia en placas de plástico en medio de cultivo RPMI 1640 libre de suero sin suero o antibióticos a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO₂. Después de aproximadamente 15-30 min de incubación, se retiraron las células no adherentes y la capa de células adherentes se lavó dos veces con 10 ml de PBS estéril enfriado con hielo. Las células adherentes se trataron durante la noche con DFO o RG7356.
- 15 Morfología celular. Se capturaron imágenes de contraste de fase con un microscopio CKX41 (Olympus) y software de obtención de imágenes cellSens Entry (Olympus) antes de trazar manualmente los ejes largo y corto de cada célula (eje largo, longitud más larga de la célula; eje corto, longitud a través del núcleo en una dirección perpendicular al eje largo) para medir el factor de elongación como la razón de estos ejes.
- 20 15 Análisis de citometría de flujo del fenotipo celular. Las células se lavaron con PBS enfriado con hielo, se incubaron con bloqueo de Fc (Human TruStain FcX, Biolegend, Londres, Reino Unido, 1/20) durante 15 min, se incubaron con anticuerpos durante 20 minutos a 4 °C y se lavaron antes del análisis usando un instrumento BD LSRFortessa X-20. Los anticuerpos fueron AlexaFluor700-CD80 (#561133, BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), PE/Cy7-CD86 (#561128, BD), APC/Alexa750-CD71 (#A89313, Beckman coulter, Brea, CA, EE.UU.), Krome orange-CD14 (#B01175, Beckman coulter), Pacific Blue-CD16 (#A82792, Beckman coulter), PE-CD163 (#556018, BD) y AlexaFluor647-CD44 (#NB500-481AF647, Novus Biologicals). Los datos se analizaron con el software FlowJo v. 10.0.00003.
- 25 20 Microscopía de inmunofluorescencia. Las células se colocaron en portaobjetos usando una centrífuga citocentrífugadora, se lavaron en PBS, se fijaron con formaldehído al 4 % en PBS durante 20 minutos, se lavaron con PBS, se sometieron a posfijación y se permeabilizaron con etanol frío al 70 % durante 20 minutos, se lavaron con PBS, se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 8 % en PBS durante 1 hora, se incubaron con el primer anticuerpo en BSA al 1 % en PBS durante 2 horas, se lavaron y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 o 555 durante 1 hora, se lavaron y se montaron usando medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.).
- 30 25 Otros experimentos de obtención de imágenes de fluorescencia. Se incubaron células vivas durante 1 hora a 37 °C con un 5 % de CO₂ en medio que contenía RhoNox-M, FITC-Hyal, TF-647. Después, las células se lavaron tres veces con PBS, se colocaron en portaobjetos usando una centrífuga citocentrífugadora y se montaron usando medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories).
- 35 30 Las imágenes de fluorescencia se adquirieron usando un microscopio en tiempo real Deltavision (Applied Precision). Se usaron objetivos de 40x/1,4NA, 60x/1,4NA y 100x/1,4NA para adquisiciones en 2D y 3D. Los datos se deconvolucionaron con SoftWorx (razón conservadora - 15 iteraciones, Applied Precision) y se procesaron con ImageJ. Todas las imágenes se adquirieron como pilas z.
- 40 35 Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente. Se limpiaron viales de vidrio equipados con septos de teflón con ácido nítrico al 65 % (VWR), se lavaron con agua ultrapura (Sigma-Aldrich) y se secaron. Las células se sembraron en placas 24 h antes de los experimentos. En todos los experimentos, las células se incubaron durante 2 h con medio libre de FBS antes del tratamiento. Las células se recogieron, seguido de dos lavados con PBS. Después, las células se contaron usando un contador de células automatizado (Entek) y se transfirieron en 100 μ l de PBS a viales limpios, y las muestras se liofilizaron usando un secador por congelación (CHRIST). Las muestras se mezclaron posteriormente con ácido nítrico al 65 % durante la noche seguido de calentamiento a 80 °C durante 2 h. Las muestras se diluyeron con agua ultrapura (Sigma-Aldrich) hasta una concentración final de ácido nítrico 0,475 N y se transfirieron a viales de centrifuga libres de metal (VWR) para el análisis de ICP-MS posterior. Se midieron las concentraciones de ⁵⁶Fe usando un instrumento Agilent 7900 ICP-QMS en modo de baja resolución. La introducción de la muestra se logró con un micro-nebulizador (MicroMist, 0,2 ml/min) a través de una cámara de pulverización Scott. Los isótopos se midieron usando una interfase de reacción de colisión con gas helio (5 ml/min) para eliminar interferencias poliatómicas. Se inyectaron patrones internos de escandio e indio después del mezclado en línea con las muestras para controlar la ausencia de deriva de señal y efectos de matriz. Se midió una mezcla de patrones certificados a concentraciones que abarcaban las de las muestras para convertir las mediciones de recuento en concentraciones en la solución. Las incertidumbres sobre las concentraciones de muestra se calcularon usando la propagación algebraica de incertidumbres de recuentos de muestras y blancos de ICP-MS. Los valores se normalizaron por peso seco y número de células.
- 55 40 Análisis de inmunotransferencia. Las células se lavaron dos veces en PBS y se lisaron en tampón Laemmli 2x que contenía benzonasa (#VWR, Fontenay-Sous-Bois, Francia), los extractos se incubaron a 37 °C durante 1 h, y se cuantificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Los lisados de proteínas se resolvieron en geles Bis-Tris al 4-12 % Nu-PAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se electrotransfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Las membranas saturadas con leche se incubaron

durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios, después durante 45 min con anticuerpos secundarios anti-IgG conjugados con peroxidasa (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, EE.UU.). Las señales se revelaron por autorradiografía usando los kits de detección quimioluminiscente potenciados SuperSignal West Pico PLUS o West Femto (Thermo Fisher Scientific).

- 5 Perfil de citocinas en sobrenadantes de macrófagos humanos. Se midieron las concentraciones de IL1 beta, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IFNgamma y TNF-alfa en sobrenadantes de cultivo celular usando el kit U-Plex Pro-Inflammatory Combo 1 humano (MSD, Rockville, MD, EE.UU.). El kit se utilizó de acuerdo con las directrices del fabricante y la señal de quimioluminiscencia se midió en un instrumento Sector Imager 2400 (MSD).

- 10 Secuenciación de ARN. El ARN extraído usando el mini kit RNeasy (QIAGEN, Germantown, MD, EE.UU.) se procesó usando el kit de preparación de bibliotecas de ARN específico de hebra automatizado SureSelect y se secuenció en un instrumento Illumina Novaseq 6000 en modo de 100 pb de extremos emparejados para alcanzar al menos 40 millones de lecturas por muestra. La validación de la expresión génica se realizará mediante qRT-PCR que se enumera a continuación.

Resultados

- 15 Los datos no publicados de los presentes inventores indican que, durante la activación de macrófagos M1, la endocitosis de hierro está regulada por incremento de una manera dependiente de CD44 y que los niveles de proteína CD44 aumentan. Además, el Fe²⁺ lisosómico aumenta en macrófagos M1 activados como se observa por RhoNox-1. Este efecto es específico para macrófagos M1 y los niveles de la proteína canónica de endocitosis de hierro TfR1/CD71 permanecen sin cambios (figuras 1 y 2).

- 20 Ejemplo 2

Material y métodos

- 25 Cultivo celular. Se recogieron muestras de sangre periférica de distintos donantes sanos (Etablissement Francais du Sang). Se aislaron pan-monocitos mediante clasificación magnética negativa usando microperlas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, 130-096-537), y se cultivaron en RPMI 1640 complementado con glutamina (Thermo Fisher Scientific, 61870010), suero bovino fetal al 10 % y se trataron con factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, Miltenyi Biotec, 130-093-866, 100 ng/ml) para inducir la diferenciación en macrófagos (MDM). En el día 5 de diferenciación, se trataron MDM con lipopolisacáridos (LPS, InvivoGen, tlr1-3pelps, 100 ng/ml, 24 h) e interferón-γ (IFNγ, Miltenyi Biotec, 130-096-484, 20 ng/ml, 24 h) para generar MDM activados (MDM act.) y se trataron conjuntamente con anticuerpo anti-CD44 RG7356 o se transfectaron con un ARNip de CD44 de control usando el sistema de transfección AMAXA Nucleofector (LONZA). Los ARN de interferencia pequeños adecuados para la regulación por disminución específica de CD44 fueron los siguientes

5'-GAAUUAUACCUGCCGCUUU-3' (SEQ ID NO: 1),

5'-CAAGUGGACUCAACGGAGA-3' (SEQ ID NO: 2),

5'-CGAAGAAGGUGUGUGGGCAGA-3' (SEQ ID NO: 3), y

- 35 5'-GAUCAACAGUGGCAUGGA-3' (SEQ ID NO: 4).

- 40 Inmunotransferencia tipo Western. Las células se trataron como se indica y después se lavaron con 1x PBS. Las proteínas se solubilizaron en tampón 2x Laemmli que contenía benzonasa (VWR, 70664-3, 1:100), los extractos se incubaron a 37 °C durante 1 h, y se cuantificaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). Los lisados de proteínas se resolvieron mediante electroforesis de SDS-PAGE (sistema sure-lock de Invitrogen y geles premoledados Bis-Tris al 4-12 % Nu-PAGE) y se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa (Amersham Protran 0,45 μm) usando una célula de transferencia electroforética semiseca Trans-Blot SD (Bio-rad). Las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5 % no grasa en Tween-20 al 0,1 %/1x PBS durante 1 h. Las transferencias se estudiaron con sonda después con los anticuerpos primarios relevantes en BSA al 5 %, Tween-20 al 0,1 %/1x PBS a 4 °C durante la noche con movimiento suave. Las membranas se lavaron con Tween-20 al 0,1 %/1x PBS tres veces y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson Laboratories) en leche desnatada en polvo al 5 % no grasa, Tween-20 al 0,1 %/1x PBS durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con Tween-20 al 0,1 %/1x PBS. Los antígenos se detectaron usando los kits de detección quimioluminiscentes SuperSignal West Pico PLUS (ThermoFisher Scientific, 34580 y 34096). Las señales se registraron usando un sistema de obtención de imágenes Fusion Solo S (Vilber) y se cuantificaron con ImageJ usando la intensidad de píxeles normalizada frente a la señal de γ-tubulina.

- 55 Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Se añadió HA (Carbosynth, FH45321, 600-1000 kDa, 1 mg/ml) junto con LPS e IFNγ y las células se trataron durante 24 h. Se limpiaron viales de vidrio equipados con septos de teflón con ácido nítrico al 65 % (VWR, Suprapur, 1.00441.0250), se lavaron con agua ultrapura (Sigma-Aldrich, 1012620500) y se secaron. Las células se recogieron seguido de dos lavados con 1x PBS. Después, las células se contaron usando un contador de células automatizado (Entek) y se transfirieron en 200 μl de 1x PBS a los

- viales de vidrio limpios, y las muestras se liofilizaron usando un secador por congelación (CHRIST, 22080). Las muestras se mezclaron posteriormente con ácido nítrico al 65 % durante la noche y se calentaron a 80 °C durante 2 h. Las muestras se diluyeron con agua ultrapura hasta una concentración final de ácido nítrico 0,475 N y se transfirieron a viales de centrifuga sin metal (VWR, 89049-172) para el análisis de ICP-MS posterior. Se midieron las cantidades de cantidades de ^{56}Fe y ^{63}Cu usando un instrumento Agilent 7900 ICP-QMS en modo de baja resolución. La introducción de la muestra se logró con un micro-nebulizador (MicroMist, 0,2 ml/min) a través de una cámara de pulverización Scott. Los isótopos se midieron usando una interfase de reacción de colisión con gas helio (5 ml/min) para eliminar interferencias poliatómicas. Se inyectaron patrones internos de escandio e indio después del mezclado en línea con las muestras para controlar la ausencia de deriva de señal y efectos de matriz. Se midió una mezcla de patrones certificados a concentraciones que abarcaban las de las muestras para convertir las mediciones de recuento en concentraciones en la solución. Las incertidumbres sobre las concentraciones de muestra se calcularon usando la propagación algebraica de incertidumbres de recuentos de muestras y blancos de ICP-MS. Los valores se normalizaron frente al número de células.

Resultados

- La regulación por disminución de CD44 usando un ARN de interferencia pequeño (ARNip) contra CD44 redujo la cantidad total de hierro en macrófagos M1 derivados de monocitos activados (MDM act.) en comparación con el ARN de control (figuras 3A, B). Además, el tratamiento con un anticuerpo bloqueante que se une a CD44 (RG7356), reduce la cantidad de hierro total en MDM act. (figura 3C). Estos datos confirmaron que CD44 media en la captación de hierro durante la activación de macrófagos inflamatorios.
- En conjunto, estos datos están insinuando hacia un papel directo de la endocitosis de hierro mediada por CD44 en la respuesta inflamatoria grave observada en pacientes con SARS-CoV-2. El Instituto Curie tiene una experiencia considerable con el uso de RG7356, un anticuerpo anti-CD44 aprobado clínicamente, que ha mostrado resultados prometedores en pacientes con cáncer con malos resultados (ensayo clínico de fase I primero en seres humanos de RG7356, un anticuerpo humanizado anti-CD44, en pacientes con tumores sólidos avanzados que expresan CD44. Oncotarget (2016), DOI: 10.18632/oncotarget.11098). En este caso, los inventores evalúan el efecto del uso de antagonistas de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) y el direccionamiento a la homeostasis del hierro, tal como mediante el uso de DFO para antagonizar la señalización de IL6 y para proteger a los pacientes con SARS-CoV-2 del CRS.

REFERENCIAS:

- A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las divulgaciones de estas referencias se incorporan por la presente por referencia en la presente divulgación.
- Crayne CB, Albeituni S, Nichols KE, Cron RQ. The Immunology of Macrophage Activation Syndrome. *Front Immunol*. 2019 Feb 1;10:119. doi:10.3389/fimmu.2019.00119.
- D'Arena G, Calapai G, Deaglio S. Anti-CD44 mAb for the treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia and other hematological malignancies: evaluation of WO2013063498. *Expert Opin Ther Pat*. 2014 Jul;24(7):821-8. doi: 10.1517/13543776.2014.915942.
- Davila ML, Riviere I, Wang X, Bartido S, Park J, Curran K, Chung SS, Stefanski J, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Qu J, Wasielewska T, He Q, Fink M, Shinglot H, Youssif M, Satter M, Wang Y, Hosey J, Quintanilla H, Halton E, Bernal Y, Bouhassira DC, Arcila ME, Gonen M, Roboz GJ, Maslak P, Douer D, Frattini MG, Giral S, Sadelain M, Brentjens R. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224):224ra25. doi: 10.1126/scitranslmed.
- Hernández-Beeftink T, Guillen-Guio B, Villar J, Flores C. Genomics and the Acute Respiratory Distress Syndrome: Current and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 16;20(16). pii: E4004. doi: 10.3390/ijms20164004.
- Khan A, Singh P, Srivastava A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator - Siderophore: A review. *Microbiol Res*. 2018 Jul-Aug;212-213:103-111. doi: 10.1016/j.micres.2017.10.012.
- Kontoghiorghe GJ. Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs. *Toxicol Lett*. 1995 Oct;80(1-3):1-18.
- Lerkvaleekul B, Vilaiyuk S. Macrophage activation syndrome: early diagnosis is key. *Open Access Rheumatol*. 2018 Aug 31; 10: 117-128. doi: 10.2147/OARRR.S151013.
- Lima TG, Benevides FLN, Esmeraldo Filho FL, Farias IS, Dourado DXC, Fontenele EGP, Moraes MEA, Quidute ARP. Treatment of iron overload syndrome: a general review. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2019 Oct 10;65(9):1216-1222. doi:10.1590/1806-9282.65.9.1216.
- Maude SL, Barrett D, Teachey DT, Grupp SA. Managing cytokine release syndrome associated with novel T cell-engaging therapies. *Cancer J*. 2014 Mar-Apr;20(2):119-22. doi: 10.1097/PPO.000000000000035.

- McKee CM, Penno MB, Cowman M, Burdick MD, Stricter RM, Bao C, Noble PW. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest.* 1996 Nov 15;98(10):2403-13. DOI: 10.1172/JCI119054.
- 5 Menke-van der Houven van Oordt CW, Gomez-Roca C, van Herpen C, Coveler AL, Mahalingam D, Verheul HM, van der Graaf WT, Christen R, Rüttinger D, Weigand S, Cannarile MA, Heil F, Brewster M, Walz AC, Nayak TK, Guarín E, Meresse V, Le Tourneau C. First-in-human phase I clinical trial of RG7356, an anti-CD44 humanized antibody, in patients with advanced, CD44-expressing solid tumors. *Oncotarget.* 2016 Nov 29;7(48):80046-80058. doi: 10.18632/oncotarget.11098.
- 10 Merad M, Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2020 May 6. doi:10.1038/s41577-020-0331-4.
- Mobarra N, Shanaki M, Ehteram H, Nasiri H, Sahmani M, Saeidi M, Goudarzi M, Pourkarim H, Azad M. A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2016 Oct 1;10(4):239-247.
- 15 Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science.* 2020 May 1;368(6490):473-474. doi: 10.1126/science.abb8925.
- Müller Sebastian, Sindikubwabo Fabien, Cañeque Tatiana, Lafon Anne, Versini Antoine, Lombard Bérangère, Loew Damarys, Durand Adeline, Vallot Céline, Baulande Sylvain, Servant Nicolas, Rodriguez Raphaël. CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *bioRxiv* 693424; doi: <https://doi.org/10.1101/693424>. Accepted in *Nature Chemistry*.
- 20 Niesler U, Palmer A, Radermacher P, Huber-Lang MS. Role of alveolar macrophages in the inflammatory response after trauma. *Shock.* 2014 Jul;42(1):3-10. doi: 10.1097/SHK.0000000000000167.
- Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 33-45, (2003).
- 25 Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. ARDS Definition Task Force. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA.* 2012 Jun 20;307(23):2526-33. doi:10.1001/jama.2012.5669.
- Shalabi H, Hahn K, Fry TJ, Shah NN. Novel Designs of Early Phase Trials for Cancer Therapeutics. Chapter 12 - Cell-Based Therapies: A New Frontier of Personalized Medicine. Editor(s): Shivaani Kummar, Chris Takimoto. Academic Press, 2018, Pages 175-191, ISBN 9780128125120, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812512-0.00012-9>.
- 30 Shimabukuro-Vornhagen A, Gödel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlößer HA, Schlaak M, Kochanek M, Böll B, von Bergwelt-Baildon MS. Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer.* 2018 Jun 15;6(1):56. doi:10.1186/s40425-018-0343-9.
- Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan-Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2016 Jun 20;54:1.30.1-1.30.33. doi: 10.1002/cpbi.5.
- 35 UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D506-D515. doi: 10.1093/nar/gky1049.
- 40 Weigand S, Herting F, Maisel D, Nopora A, Voss E, Schaab C, Klammer M, Tebbe A. Global quantitative phosphoproteome analysis of human tumor xenografts treated with a CD44 antagonist. *Cancer Res.* 2012 Sep 1;72(17):4329-39. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0136.
- Whyte CS, Morrow GB, Mitchell JL, Chowdary P, Mutch NJ. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of thrombolytic drugs to treat COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020 Apr 23. doi:10.1111/jth.14872.
- 45 Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, Guan L, Wei Y, Li H, Wu X, Xu J, Tu S, Zhang Y, Chen H, Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020 Mar 28;395(10229):1054-1062. doi:10.1016/S0140-6736(20)30566-3. Erratum in: *Lancet.* 2020 Mar 28;395(10229):1038. *Lancet.* 2020 Mar 28;395(10229):1038.
- 50 Zhou M, Zhang X, Qu J. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): a clinical update. *Front Med.* 2020 Apr; 14(2):126-135. doi: 10.1007/s11684-020-0767-8.
- Zöller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254-267, (2011).

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico para su uso en el tratamiento del síndrome de liberación de citocinas en un sujeto que lo necesita, en donde dicho antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) se selecciona del grupo que consiste en un compuesto que se dirige a CD44 seleccionado del grupo que consiste en antagonistas de CD44 e inhibidores de la expresión de CD44.
5
2. El antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el síndrome de liberación de citoquinas es síndrome de liberación de citoquinas relacionado con COVID-19 grave.
3. El antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho antagonista de CD44 se selecciona del grupo que consiste en molécula orgánica pequeña, polipéptido, aptámero o anticuerpo.
10
4. El antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en RG7356 y Bivatuzumab.
5. El antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho inhibidor de la expresión de CD44 se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido antisentido, ARNhc, ARNip, iARN y ribozima.
15
6. El antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento del síndrome de dificultad respiratoria (ARDS) en un sujeto que lo necesita.
7. El antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento del síndrome de activación de macrófagos (MAS) en un sujeto que lo necesita.
20
8. El antagonista de la ruta de CD44/ácido hialurónico (HA) para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias relacionadas con el hierro y respuestas inflamatorias alveolares en un sujeto que lo necesita.

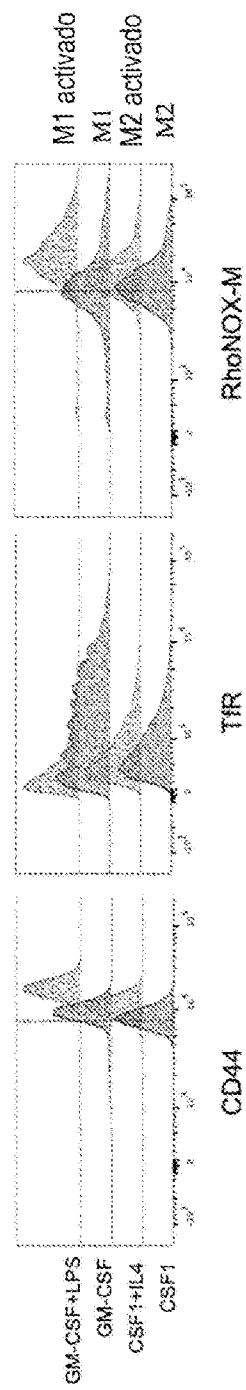


Figura 1

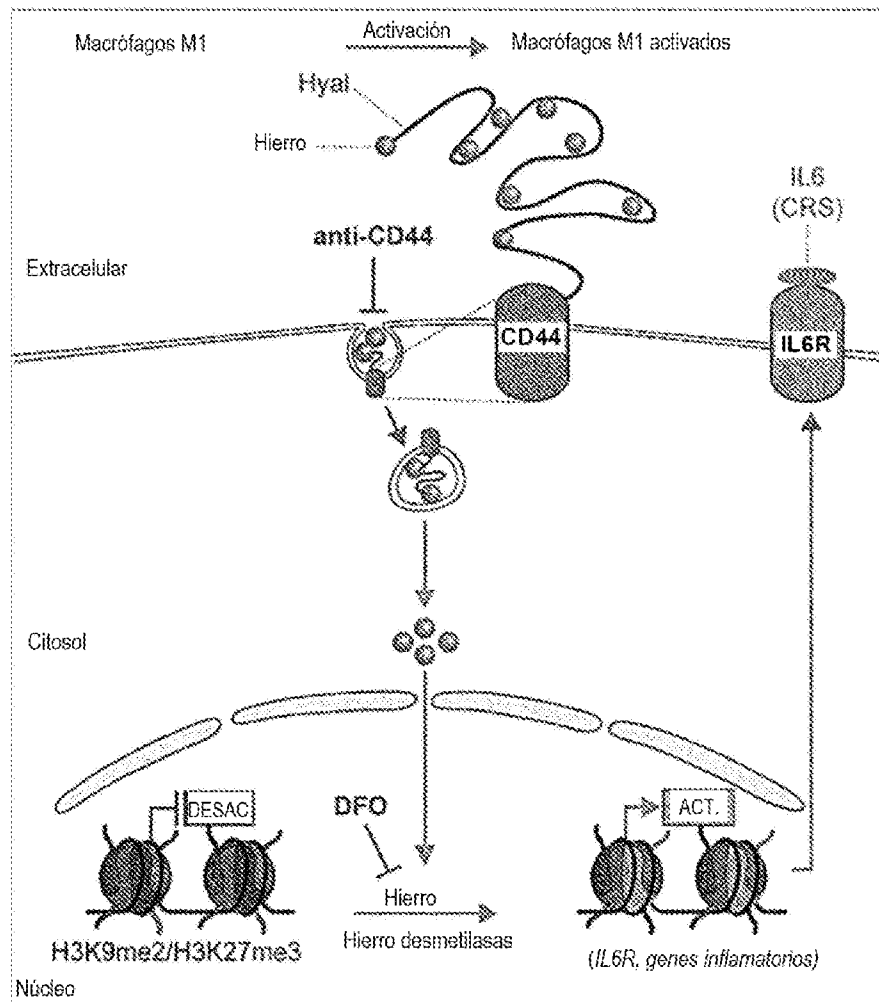


Figura 2

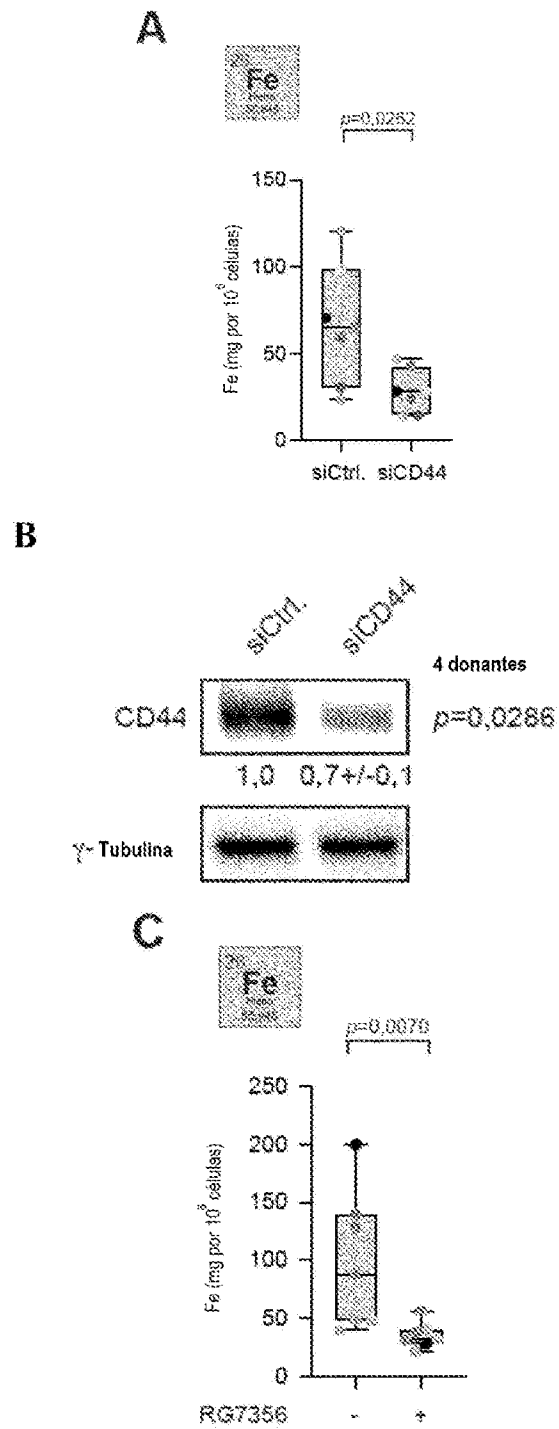


Figura 3