



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 184**

51 Int. Cl.:
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05752687 .3**
96 Fecha de presentación : **20.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1817337**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.08.2007**

54 Título: **Péptidos terapéuticos que comprenden secuencias derivadas de CDR2 o CDR3 de TREM-1 y el uso de los mismos para inhibir sepsis.**

30 Prioridad: **29.11.2004 GB 0426146**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2011

73 Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**
Novo Allé
2880 Bagsvård, DK
Université Henri Poincaré - Nancy 1

72 Inventor/es: **Faure, Gilbert;**
Gibot, Sebastien;
Panina, Paola y
Passini, Nadia

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 360 184 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos terapéuticos que comprenden secuencias derivadas de CDR2 o CDR3 de TREM-1 y el uso de los mismos para inhibir sepsis.

5 La presente invención se refiere al campo de inmunología. Más particularmente, la presente invención se refiere a polipéptidos y derivados de los mismos, que son capaces de actuar como antagonistas de la proteína TREM-1, y son útiles en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, sepsis y shock séptico.

10 La sepsis constituye un consumo significativo de recursos de cuidados intensivos y es un problema permanente en la unidad de cuidados intensivos. Se estima que entre 400 000 y 500 000 pacientes son así afectados cada año en EEUU y Europa. Los índices de morbilidad y mortalidad se han mantenido altos a pesar de las mejoras tanto en terapias de apoyo como en terapias antimicrobianas. Los índices de mortalidad varían de 40% para la sepsis leve a 80% en aquellas que sufren de shock séptico y disfunción multiorgánica. La patogénesis de las condiciones se comprende ahora mejor.
15 Una mejor comprensión de la red compleja de los mediadores inmunológicos, inflamatorios y hematológicos puede permitir el desarrollo de terapias nuevas y racionales.

Después de una infección, las respuestas inmunológicas cognitivas e innatas se desarrollan en fases secuenciales que aumentan en especificidad y complejidad, resultando en última instancia en una depuración de agentes infecciosos y una restauración de homeostasis. La respuesta inmunitaria innata sirve como primera línea de defensa y se inicia en la activación de receptores de reconocimiento de patrones, tales como receptores de tipo Toll (TLRs) (1, 2), por varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (3). La activación de los TLRs provoca la liberación de grandes cantidades de tales citocinas como TNF- α y IL-1 β , que, en el caso de tales infecciones masivas como sepsis, pueden precipitar la herida de tejido y el shock letal (4, 5). A pesar de que los antagonistas de TNF- α y IL-1 β aparecen en este contexto como agentes terapéuticos posiblemente interesantes de sepsis, desafortunadamente se ha demostrado una eficacia limitada en ensayos clínicos (6-8). Esto podría ser debido al hecho de que estas citocinas son necesarias para la depuración de infecciones, y que su eliminación permitiría un fatal crecimiento bacteriano (9-11).

30 Otro receptor implicado en, entre otras cosas, la respuesta a la infección, el receptor activador expresado en células mieloides-1 (TREM-1) es un elemento de una familia de receptores recientemente descubierta, la familia TREM, expresada en la superficie de neutrófilos y un subconjunto de monocitos. Los receptores TREM activan las células de mielocite mediante la asociación con la molécula adaptadora DAP12. El acoplamiento de las TREM-1 ha sido proporcionado para provocar la síntesis de citocinas proinflamatorias en presencia de productos microbianos.

35 El receptor activador expresado en las células mieloides (TREM)-1 es una molécula de superficie de célula recientemente descubierta que ha sido identificada tanto en humanos como en neutrófilos polimorfonucleares de murina y monocitos maduros (12). Pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y activa las vías de señalización de corriente con la ayuda de una proteína adaptadora llamada DAP12 (12-15). Bouchon y colaboradores han mostrado que la expresión de TREM-1 fue inmensamente aumentada en los neutrófilos y los monocitos en presencia de tales bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, tanto en cultivo celular y en muestras de tejido de pacientes con infección (16). Contrastándolas, TREM-1 no fue aumentada en muestras de pacientes con enfermedades inflamatorias no infecciosas tales como la psoriasis, colitis ulcerosa o vasculitis provocada por complejos inmunológicos (16). Por otra parte, cuando TREM-1 se une a su ligando, hay un efecto sinérgico de LPS y una síntesis amplificada de las citocinas proinflamatorias TNF- α y GM-CSF, junto con una inhibición de la producción IL-10 (17). En un modelo de murina de shock séptico inducido por LPS, el bloqueo de la señalización TREM-1 protegió a los animales de la muerte, además resaltaron el papel crucial de esta molécula (13, 16).

50 Estudios recientes demuestran que TREM-1 juega un papel crítico en la respuesta inflamatoria a la infección (véase Bouchon *et al.* (2000) *J. Immunol.* 164:4991-4995). La expresión de TREM-1 se aumenta en células mieloides en respuesta tanto a infecciones fúngicas como a infecciones bacterianas en seres humanos. De forma similar, en ratones la inducción del shock mediante el lipopolisacárido (LPS) se asocia a la expresión aumentada del TREM-1. Además, el tratamiento de ratones con una proteína de fusión soluble TREM-1/Ig, como receptor "señuelo", evita que los ratones se mueran debido a LPS o *E. coli*.

55 La US 6,420,526 con el título "186 Secreted Proteins" reivindica fragmentos aislados de TREM-1 que contienen al menos 30 aminoácidos contiguos de TREM-1 humana no especificados ni ejemplificados. No hay datos biológicos relacionados con tales fragmentos.

60 Como se describe en la US2003165875A, las proteínas de fusión entre la región constante de IgG1 humano y el dominio extracelular de TREM-1 de ratón o de TREM-1 humano muestran un efecto contra la endotoxemia en ratones.

Los inventores han encontrado sorprendentemente que los péptidos determinados derivados de la proteína TREM-1 son capaces de actuar como antagonistas de la proteína TREM-1 y por lo tanto tienen aplicaciones en el tratamiento de sepsis y del shock séptico. Los Inventores además demuestran que los mismos péptidos también modulan *in vivo* la cascada proinflamatoria provocada por la infección, inhibiendo así la hiper-receptividad y la muerte en un modelo animal de sepsis.

ES 2 360 184 T3

Anteriormente, los Inventores han identificado una forma soluble de TREM-1 (sTREM-1) y han observado niveles significantes en muestras de suero de pacientes de shock séptico pero no de controles. Como también se ha descrito aquí los Inventores han investigado su papel putativo en la modulación de la inflamación durante la sepsis (véase Gibot *et al.* (2004) *Ana. Intern. Med.* 141(1):9-15 y Gibot *et al.* (2004) *N. Engl. J. Med.* 350(5):451-8).

Como se describe en este caso, los Inventores muestran que una forma soluble de TREM-1 (sTREM-1) se libera en la sangre periférica durante agresiones infecciosas en ratones. Los Inventores también confirman que los monocitos son una fuente más importante de sTREM, y muestran que los péptidos sintéticos que imitan una parte del dominio extra-celular de TREM-1 pueden modular la producción de citocina por monocitos activados *in vitro*.

Los Inventores han observado que sTREM-1 se segrega por los monocitos activados *in vitro* por LPS, al igual que en el suero de animales implicados en un modelo experimental de shock séptico. Tanto *in vitro* como *in vivo*, los péptidos sintéticos que imitan un dominio corto altamente conservado de sTREM-1 atenúan la producción de citocinas por monocitos humanos y protegen a los animales sépticos de la hiper-receptividad y de la muerte. Estos péptidos son eficaces no sólo para prevenir sino también para disminuir los efectos deletéreos de citocinas proinflamatorias. Estos datos demuestran que la modulación *in vivo* de TREM-1 por péptidos de TREM-1 es una herramienta terapéutica valiosa para el tratamiento de infecciones, por ejemplo sepsis o shock séptico o para el tratamiento de condiciones sépticas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona polipéptidos y derivados de los mismos, que son capaces de actuar como antagonistas de la proteína TREM-1, y son útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas, en particular, sepsis y shock séptico o para el tratamiento de condiciones sépticas.

Como se describe en este caso, los Inventores han determinado que diferentes péptidos de la parte extracelular de la proteína TREM-1 (véase la tabla 1), cuyas secuencias incorporadas de "CDR2" y "CDR3" sorprendentemente tienen actividad similar a las proteínas de fusión previamente descritas de la región constante IgG1 y el dominio extracelular de TREM-1 en modelos de sepsis. Estos péptidos también tienen ventajas sobre la proteína particularmente en cuanto a coste de producción se refiere.

Así, en un aspecto la presente invención proporciona polipéptidos o derivados de los mismos, que son capaces de actuar como antagonistas de la proteína TREM-1 tal y como se define en SEC ID N°. 1, y comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20 o al menos 3 aminoácidos de la SEC ID N°: 21, donde:

(a) el polipéptido consiste en:

(i) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 1; o

(ii) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 1 en la que un aminoácido se sustituye de forma conservadora por otro aminoácido;

o

(b) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°s: 16, 17, 18 o 19;

y donde los derivados de los polipéptidos de (a) o (b) se modifican con glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, o derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos.

En una forma de realización particular, el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 19.

En formas de realización donde los polipéptidos consisten en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a la secuencia de SEC ID N°s: 16, 17, 18 o 19, los polipéptidos pueden diferir de dichas secuencias sólo por modificaciones conservadoras.

En formas de realización donde los polipéptidos consisten en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a la secuencia de SEC ID N°s: 16, 17, 18 o 19, los polipéptidos pueden consistir en las secuencias de aminoácidos de la SEC ID N°: 16, 17, 18 o 19. En particular, los polipéptidos pueden consistir en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19.

En formas de realización donde el polipéptido contiene al menos 3 aminoácidos de SEC ID N°. 21, al menos 3 aminoácidos de SEC ID N°. 21 pueden ser QPP, QPPK o QPPKE.

En otro aspecto la presente invención proporciona polipéptidos o derivados de los mismos, que son capaces de actuar como antagonistas de la proteína TREM-1 como está definido en la SEC ID N°. 2, y comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°. 22 o al menos 3 aminoácidos de SEC ID N°. 23, donde:

ES 2 360 184 T3

(a) el polipéptido consiste en:

(i) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 2 o

(ii) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 2 en la que un aminoácido se sustituye de forma conservadora con otro aminoácido;

o

(b) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°s: 3, 4 6, o 7;

y donde los derivados de los polipéptidos de (a) o (b) se modifican con glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, o derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos.

En formas de realización donde el polipéptido contiene al menos 3 aminoácidos de SEC ID N°. 23, al menos 3 aminoácidos de SEC ID N°. 21 pueden ser HPP, HPPN o HPPND.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido que es una proteína de fusión que consiste en un polipéptido o derivado como se ha descrito anteriormente y un polipéptido heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una secuencia derivada de una inmunoglobulina, proteínas andamio de alternativa no tradicional, secuencias señal heterólogas fundidas al término N del polipéptido o derivado, y secuencias de marcadores.

En otro aspecto, la presente invención proporciona polipéptidos de la invención que se caracterizan por la capacidad para tratar sepsis o shock séptico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona polinucleótidos aislados capaces de codificar polipéptidos de la invención. También se proporciona vectores que contienen tales polinucleótidos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona los polipéptidos de la invención para el uso en terapia.

En otro aspecto, la presente invención proporciona los polipéptidos de la invención para su uso en el tratamiento de sepsis o shock séptico.

En otro aspecto, la presente invención provee el uso de los polipéptidos de la invención en la producción de un medicamento para el tratamiento de sepsis o shock séptico.

Como se muestra en la tabla 1, ejemplos de tales péptidos o polipéptidos, contienen o comprenden por ejemplo 15-25 péptidos aminoácidos ("AA") de la proteína TREM-1 y contienen o comprenden todo o parte de un dominio CDR (3-6 AAs) del receptor flanqueado por secuencias naturales de la proteína que pueden variar en longitud mientras que la función del dominio tipo CDR no se pierda. Tales péptidos son derivados de una secuencia de aminoácidos de la proteína del receptor TREM-1, como se muestra en la tabla 2 (seres humanos) y en la tabla 3 (ratones).

La tabla 1 muestra que los péptidos derivados de "mPX" TREM-1 de ratón (secuencias de referencia NCBI (RefSec) NP_067381) o "hPX" de TREM-1 humana (secuencias de referencia NCBI (RefSec) NP_061113). Aminoácidos subrayados abarcan las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de TREM-1 humana, como se describe en Radaev *et al.* 2003 Structure (Camb.) 11 (12), 1527-1535 (2003).

La tabla 2 muestra la secuencia de aminoácidos NP 061113 TREM-1 de seres humanos. Los aminoácidos subrayados abarcan las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de TREM-1 humana 2 (RPSKNS; [SEC ID NO:20]) y 3 (QPPKE [SEC ID NO: 21]), como se describe en Radaev *et al.* 2003 Structure (Camb.) 11 (12), 1527-1535 (2003).

La tabla 3 muestra la secuencia de aminoácidos NP 067381 TREM-1 del ratón. Los aminoácidos subrayados abarcan las regiones de determinación complementaria (CDR) TREM-1 del ratón, 2 (RPFTRP; [SEC ID NO:22]) y 3 (HPPND; [SEC ID NO: 23]).

ES 2 360 184 T3

TABLA 1

Péptidos que incluyen secuencias de CDR2 y CDR3 de TREM-1 humana y de ratón

5
10
15
20
25

hCDR 2	
mP1 (67-89) :[SEC ID Nº : 3]	LVV <u>TQRPFTRP</u> SEVHMGKFTLKH
hP1 (67-89) :[SEC ID Nº : 16]	LACTER <u>PSKNSH</u> PVQVGRIILED
hCDR 3	
mP2 (114-136) :[SEC ID Nº : 4]	VIYHPPNDPVVLFHPVRLVVTKG
mP4 (103-123) :[SEC ID Nº : 6]	LQVTD <u>SGLYRCVIYHPP</u> NDPV
mP5 (103-119) :[SEC ID Nº : 7]	LQVTD <u>SGLYRCVIYHPP</u>
hP2 (114-136) :[SEC ID Nº : 17]	VIYQPPKEPHMLFDRIRLVVTKG
hP4 (103-123) :[SEC ID Nº : 18]	LQVED <u>SGLYQCVIYQPP</u> KEPH
hP5 (103-119) :[SEC ID Nº : 19]	LQVED <u>SGLYQCVIYQPP</u>

TABLA 2

Secuencia de aminoácidos NP_061113 de TREM-1 humana

30
35
40

1	MRKTRLWGLL	WMLFVSELRA	ATKLTEEKYE	LKEGQTLQVK	CDYTLEKFAS	SQKAWQIIRD
61	GEMPKTLACT	<u>ERPSKNSHPV</u>	QVGRILEEDY	HDHGLLRVRM	VNLQVEDSGL	YQCVIYQPPK
121	<u>EPHMLFDRIR</u>	LVVTKGFSGT	PGSNENSTQN	VYKIPPTTK	ALCPLYTSR	TVTQAPPKST
181	ADVSTPDSEI	NLTNVTDIIR	VPVENIVILL	AGGFLSKSLV	FSVLFAVTLR	SFVP
	[SEC ID Nº : 1]					

TABLA 3

Secuencia de aminoácidos NP_067381 de TREM-1 humana

45
50
55

1	MRKAGLWGLL	CVFFVSEVKA	AIVLEEERYD	LVEGQTLTVK	CPFNIMKYAN	SQKAWQRLPD
61	GKEPLTLVVT	<u>QRPFTRPSEV</u>	HMGKFTLKH	PSEAMLQVQM	TDLQVTD <u>SGLYRCVIYHPP</u>	
121	<u>DPVVL</u> FHPVR	LVVTKGSSDV	FTPVIIPITR	LTERPILITT	KYSPSDTTT	RSLPKPTAVV
181	SSPGLGVTII	NGTDADSVST	SSVTISVICG	LLSKSLVFII	LFIVTKRTEFG	
	[SEC ID Nº : 2]					

60
65

Por consiguiente, los aquí descritos polipéptidos o péptidos son aislados o preparados por recombinación que comprenden o que consisten esencialmente en una o más secuencias derivadas de CDR2 o CDR3 de una proteína TREM-1, o fragmentos, homólogos, derivados, proteínas de fusión o variantes de tales polipéptidos.. Generalmente donde polipéptidos o proteínas o fragmentos, homólogos, derivados, o variantes de las mismas se destinan para el uso (por ejemplo tratamiento) en unas especies particulares, las secuencias de CDR2 o CDR3 de una proteína TREM-1 son elegidas de la secuencia de aminoácidos de proteína TREM-1 de estas especies, o si la secuencia no es conocida, una especie análoga. Por ejemplo, los polipéptidos o proteínas para el tratamiento de enfermedades humanas, en particular sepsis, shock séptico o condiciones sépticas, comprenderán una o más secuencias que comprendan toda o parte de las CDR2 o CDR3 de la proteína humana TREM-1.

Además, aquí se describen polipéptidos o proteínas aisladas que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 20, 21, 22, 23 o fragmentos, homólogos, derivados, o variantes de los mismos. Los péptidos, polipéptidos o proteínas aislados descritos aquí pueden comprender o consistir en al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 o más aminoácidos contiguos de una proteína TREM-1 de la cual 3 o más aminoácidos contiguos se derivan de las secuencias de SEC ID NO: 20, 21, 22 o 23 (en otras palabras una secuencia que representa toda, o parte de CDR2 o CDR3 de una proteína TREM-1 está presente en el péptido, polipéptido o proteína), o fragmentos, homólogos, derivados, o variantes de los mismos. Tales péptidos, polipéptidos o proteínas, o fragmentos, homólogos, derivados o variantes de los mismos pueden tener una actividad biológica de una proteína TREM-1 en toda su longitud, tal como antigenicidad, inmunogenicidad, activación de quimiocinas proinflamatorias y citocinas, movilización de citosólico Ca^{2+} , fosforilación de proteína tirosina, liberación de mediador, y otras actividades fácilmente contrastable. Generalmente, tales péptidos, polipéptidos o proteínas o fragmentos, homólogos, derivados o variantes de los mismos son capaces de tratar la sepsis, el shock séptico o condiciones sépticas, o están activos en modelos experimentales de sepsis, shock séptico o condiciones sépticas, por ejemplo actuando como antagonistas de la actividad del receptor TREM-1. Tales péptidos, polipéptidos o proteínas o fragmentos, homólogos, derivados o variantes de los mismos se caracterizan por la capacidad para tratar, mejorar, o disminuir los síntomas de la sepsis, del shock séptico o condiciones tipo sepsis.

Aquí se describen los polipéptidos TREM-1 con actividad contra sepsis, shock séptico o condiciones sépticas que consisten en (i) una secuencia contigua de 5 a 29, por ejemplo 15-25, aminoácidos correspondientes a la secuencia de proteína nativa TREM-1 que incluye al menos 3 aminoácidos de las secuencias CDR2 o CDR3; o (ii) tal secuencia en la que uno o más aminoácidos se sustituyen de forma conservadora por otro aminoácido proporcionado, a pesar que al menos 3 aminoácidos del CDR2 o CDR3 secuencias no son sustituidos; o (iii) una secuencia de (i) o (ii) vinculado a uno o ambos de sus terminales N y C a un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, en un polipéptido donde la secuencia de proteína nativa TREM-1 es la secuencia humana identificada como [SEC ID n°: 1], las secuencias CDR2 y CDR3 son RPSKNS y QPPKE respectivamente. En tales polipéptidos, al menos 3 aminoácidos de las secuencias CDR2 o CDR3 pueden ser QPP, PPK, PKE, RPS, PSK, SKN o KNS. Tales polipéptidos pueden comprender la secuencia QPPK, QPPKE o RPSKNS. Por ejemplo, en un polipéptido donde la secuencia de proteína nativa TREM-1 es la secuencia de ratón identificada como [SEC ID n°: 2] las secuencias CDR2 y CDR3 son RPFTRP y HPPND respectivamente. En tales polipéptidos, al menos 3 aminoácidos de las secuencias CDR2 o CDR3 pueden ser HPP, PPN, PND, RPF, PFT, FTR o TRP. Tales polipéptidos pueden comprender las secuencias HPP, HPPN, HPPND o RPFTRP.

Los polipéptidos o péptidos de la invención se proveen para su uso en terapia, en particular en el tratamiento de sepsis, shock séptico y condiciones tipo sepsis, y para el uso en la producción de un medicamento para el tratamiento de sepsis, shock séptico y condiciones tipo sepsis. Además están descritas las composiciones y composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos o péptidos de la invención y métodos de tratamiento de sepsis, shock séptico y condiciones tipo sepsis usando polipéptidos o péptidos de la invención. Además están descritos los polipéptidos o péptidos de la invención para su uso en terapia para restaurar los parámetros hemodinámicos en sepsis, shock séptico y condiciones tipo sepsis y para su uso en la producción de un medicamento para el tratamiento de parámetros hemodinámicos aberrantes en sepsis, shock séptico y condiciones tipo sepsis.

El término “receptor activador sobre células mieloides” o “TREM” se refiere a un grupo de receptores activantes que están selectivamente expresados en diferentes tipos de células mieloides, tales como mastocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), y neutrófilos, y pueden tener un papel predominante en respuestas inflamatorias e inmunológicas. Las TREMs son principalmente glicoproteínas de transmembrana con un pliegue de tipo Ig en sus dominio extracelular y, por lo tanto, pertenecer al SF Ig. Estos receptores contienen un dominio corto intracelular, pero carecen de motivos de acoplamiento para la señalización de los mediadores y para requerir proteínas de adaptador, tales como DAP12, para activar las células.

El término “células mieloides” como se utiliza en este caso se refiere a una serie de linajes de célula derivados de la médula que incluye granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, y basófilos), monocitos, macrófagos, y mastocitos. Además, también se incluyen las células dendríticas de sangre periférica de origen de mieloides, y células dendríticas y macrófagos derivados *in vitro* de monocitos en presencia de condiciones de cultivo apropiadas.

El término “sepsis, shock séptico” o “sepsis o shock séptico” tal y como se define aquí, se refiere a subgrupos de síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). El término “sepsis” es generalmente reservado para SRIS cuando se sospecha o se tiene ya la infección. Un modelo de variables fisiológicas ha sido mostrado en pacientes crucialmente enfermos en respuesta a una gama de injurias que incluye; traumatismo, quemaduras, pancreatitis e infección. Estos incluyen respuestas inflamatorias, leucocitosis o leucopenia severa, hipertermia o hipotermia, taquicardia y taquipnea y han sido colectivamente denominados síndrome de respuesta inflamatorios sistémica (SRIS). Esta definición enfatiza la importancia del proceso inflamatorio en estas condiciones independientemente de la presencia de infección. Sepsis es posteriormente estratificada en sepsis severa cuando hay evidencia de hipoperfusión de órganos, por signos hechos evidentes de disfunción de órganos tal como hipoxemia, oliguria, acidosis láctica o función cerebral alterada. “Shock séptico” es sepsis severa normalmente complicada por hipotensión, definido en seres humanos como presión sanguínea sistólica menor a 90 mmHg a pesar de una regeneración de fluido adecuada. Sepsis y SRIS se pueden complicar por la disfunción de dos o más órganos, llamada disfunción orgánica múltiple (MOF, por sus siglas en inglés), debido a una perfusión y oxigenación orgánica desordenada. Además de los efectos sistémicos de la infección, se puede dar una respuesta inflamatoria sistémica en condiciones severas inflamatorias tales como pancreatitis y quemaduras. La

aparición de signos de una respuesta inflamatoria es menos definida de peor manera tras las injurias traumáticas. En la unidad de cuidados intensivos, bacterias gram-negativas se implican en 50 a 60% de casos de sepsis con un conteo de bacterias gram-positivas durante otro 35 a 40% de los casos. El resto de los casos se deben a las causas de hongos, virus y protozoos menos comunes.

5

El término “condiciones tipo sepsis” como se utiliza en este caso se refiere a los estados en los que un paciente se presenta con síntomas similares a la sepsis o shock séptico pero donde un agente infeccioso no es la causa inicial o primaria de una cascada similar de mediadores inflamatorios y/o cambio en parámetros hemodinámicos como se ha visto en casos de sepsis, por ejemplo en pacientes con insuficiencia hepática crónica o aguda (véase Wasmuth HE, *et al.* J Hepatol. 2005 Feb; 42(2):195-201), en casos de enfermedad de postreanimación después de un paro cardíaco (véase Adrie C *et al.* Curr Opin Crit Care. 2004 Jun; 10(3):208-12) en el tratamiento de síntomas de tipo sepsis después de quimioterapia para el cáncer (véase Tsuji E *et al.* Int J Cancer 2003 Nov 1; 107(2):303-8) en pacientes que están experimentando una perfusión de brazo hipertérmica aislada con TNF α recombinante o tratamientos similares (véase Zwaveling JH *et al.* Crit Care Med. 1996 May; 24(5):765-70) o enfermedades de tipo sepsis en neonatos (véase Griffin MP *et al.* Pediatr Res. 2003 Jun; 53(6):920-6).

15

El término “actividad contra la sepsis, shock séptico o condiciones tipo sepsis” como se utiliza en este caso se refiere a la capacidad de una molécula, por ejemplo un péptido, polipéptido o anticuerpo creado genéticamente, para tratar la sepsis, shock séptico o condiciones tipo sepsis, o estar activos en modelos experimentales de sepsis, shock séptico o condiciones tipo sepsis, actuando por ejemplo como un antagonista de la actividad del receptor TREM-1.

20

Típicamente la indicación para polipéptidos de la invención es sepsis o shock séptico.

El término “secuencia de identidad sustancial”, cuando se usa en relación con secuencias de péptidos/aminoácidos, se refiere a secuencias de péptidos/aminoácidos que son sustancialmente idénticas o similares en secuencia, dando lugar a una homología en la conformación y por lo tanto a la actividad biológica similar. El término no está destinado a implicar una evolución común de las secuencias.

25

Típicamente, las secuencias de péptidos/aminoácidos con “identidad de secuencia sustancial” son secuencias que son al menos 50%, más preferiblemente al menos 80%, idénticas en secuencia, al menos sobre cualquier región conocida por intervenir en la actividad deseada. De la forma más preferible, no más de cinco residuos, a parte de en los términos, son diferentes. Preferiblemente, la divergencia en la secuencia, al menos en las regiones mencionadas, se presenta en forma de “modificaciones conservadoras”.

30

Para determinar el porcentaje de la identidad de secuencia de las secuencias de dos péptidos/aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para lograr comparaciones óptimas. Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácido o posiciones de nucleótido correspondientes son luego comparadas. Cuando se ocupa una posición en la primera secuencia por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se utiliza aquí “identidad” de aminoácidos o de ácido nucleicos es equivalente a “homología” de aminoácidos o de ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesita ser introducida para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede realizar usando un algoritmo matemático. En una forma de realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que ha sido incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando o una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En otra forma de realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapADN.CMP y un peso de espacio de 40, 50, 60, 70, u 80, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En otra forma de realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se determina usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que han sido incorporadas en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12, y una penalización de espacio de 4. El ácido nucleico y las secuencias proteínicas de la presente invención pueden además ser usadas como una “secuencia de consulta” para ejecutar una búsqueda contra bases de datos públicas para identificar, por ejemplo, otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden ser realizadas usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Se pueden realizar búsquedas de nucleótidos con BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos NIP2b, NIP2cL, y NIP2cS de la invención. Las búsquedas de proteína con BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteínas NIP2b, NIP2cL, y NIP2cS. Para obtener alineamientos distanciados para fines comparativos, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

55

60

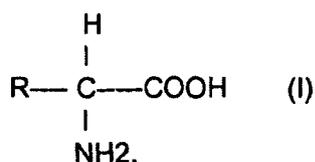
65

ES 2 360 184 T3

Los términos “proteína” y “polipéptido” se usan aquí de forma intercambiable. El término “péptido” se utiliza en este caso para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos o análogos de aminoácidos (incluyendo aminoácidos que se originan de forma no natural), con aminoácidos adyacentes unidos por enlaces peptídicos (-NHCO-). Así, los péptidos de la invención incluyen oligopéptidos, polipéptidos, proteínas, mimetopes y peptidomiméticos. Los métodos para la preparación de mimetopos y peptidomiméticos se conocen en la técnica.

Los términos “mimetopo” y “peptidomimético” se usan de forma intercambiable aquí. Un “mimetopo” de un compuesto X se refiere a un compuesto en el que las estructuras químicas de X necesarias para la actividad funcional de X ha sido sustituida con otras estructuras químicas que imitan la conformación de X. Los ejemplos de peptidomiméticos incluyen compuestos peptídicos en los que el esqueleto peptídico se sustituye con una o más moléculas de benzodiazepina (véase por ejemplo, James, G.L. *et al.* (1993) *Science* 260:1937-1942) y péptidos “retro-inversos” (véase la patente estadounidense n.º. 4,522,752 de Sisto). Los términos “mimetopo” y “peptidomimético” también se refieren a una fracción, distinta de un aminoácido de origen natural, que sirve conformacional y funcionalmente como sustituto para un aminoácido particular en un compuesto que contiene péptidos sin interferir contrariamente en una extensión significativa con la función del péptido. Algunos ejemplos de miméticos de aminoácido incluyen D-aminoácidos. Los péptidos sustituidos con uno o más D-aminoácidos pueden ser hechos usando procedimientos bien conocidos de síntesis de péptidos. Las sustituciones adicionales incluyen análogos de aminoácidos con cadenas laterales variantes con grupos funcionales, por ejemplo, de B-cianoalanina, canavanina, ácido djencólico, norleucina, 3-fosfoserina, homoserina, dihidroxifenilalanina, 5-hidroxitriptófano, 1-metilistidina, o 3-metilistidina.

Como se utiliza en este caso un “análogo” de un compuesto X se refiere a un compuesto que retiene estructuras químicas de X necesarias para la actividad funcional de X, pero que también contiene ciertas estructuras químicas diferentes de X. Un ejemplo de un análogo de un péptido origen natural es un péptido que comprende uno o más aminoácidos de origen no natural. El término “análogo” está también destinado a incluir mimetopos modificados y/o peptidomiméticos, péptidos y polipéptidos modificados, y variantes alélicas de péptidos y polipéptidos. Los análogos de un péptido por lo tanto producirán un análogo peptídico que es sustancialmente homólogo o, en otras palabras, tiene identidad de secuencia sustancial al péptido original. El término “aminoácido” incluye su significado reconocido por la técnica y en general comprende compuestos de fórmula I:



Aminoácidos preferidos incluyen los aminoácidos de origen natural, al igual que derivados sintéticos, y aminoácidos derivados de proteínas, por ejemplo, proteínas tales como caseína, es decir, casamino ácidos, o digeridos químicos o enzimáticos de, por ejemplo, levadura, un producto animal, por ejemplo, un digerido cárnico, o un producto de planta, por ejemplo, proteína de soja, proteína de semilla de algodón, o un extracto soluble de maíz (véase, por ejemplo, *Traders' Guide to Fermentation Media*, Traders Protein, Memphis, TN (1988), *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*, Sinauer Associates, Sunderland, MA (1989), and *Product Data Sheet for Corn Steep Liquor*, Grain Processing Corp., IO).

El término “aminoácido de origen natural” incluye cualquiera de los 20 residuos de aminoácidos que comúnmente comprenden más polipéptidos en sistemas vivos, aminoácidos encontrados en proteínas fibrosas menos comunes (p. ej., 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, N-metilisina, 3-metilistidina, desmosina, isodesmosina), y aminoácidos de origen natural no encontrados en proteínas (p. ej., - ácido aminobutírico, homocisteína, homoserina, citrulina, ornitina, canavanina, ácido djencólico, y cyanoalanina).

El término “cadena lateral de un aminoácido natural” está destinado a incluir la cadena lateral de cualquiera de los aminoácidos de origen natural, representados como R en la fórmula I. Un experto en la técnica entenderá que la estructura de la fórmula I está destinada a comprender aminoácidos tales como prolina donde la cadena lateral es una estructura heterocíclica o cíclica (p. ej., en el grupo R de prolina y el grupo amino forman un anillo heterocíclico de cinco miembros).

El término “homólogo”, tal como se usa aquí, se refiere a cualquier miembro de una serie de péptidos o polipéptidos con una actividad biológica común, incluyendo antigenicidad/inmunogenicidad y actividad reguladora de la inflamación, y/o dominio estructural y que tiene suficientes aminoácidos como se define en este documento. Tales homólogos pueden ser de la misma especie o de especies diferentes de animales.

El término “variante” como se utiliza en este caso se refiere o a una variación alélica de origen natural de un péptido dado o a una variación preparada de recombinación de un péptido dado o proteína en donde uno o más residuos de aminoácidos han sido modificados por sustitución, adición o delección de aminoácidos.

ES 2 360 184 T3

El término “derivativo” como se utiliza en este caso se refiere a una variación de péptido dado o proteína que son modificados de otra manera, es decir, por unión covalente de cualquier tipo de molécula, teniendo preferiblemente bioactividad, al péptido o proteína, incluyendo los aminoácidos de origen no natural.

5 Preferiblemente, tales homólogos, variantes y derivados son capaces de tratar la sepsis, shock séptico o sépticas, o están activos en modelos experimentales de sepsis, shock séptico o condiciones de sepsis, por ejemplo actuando como antagonistas de la actividad del receptor TREM-1.

10 Un péptido o proteína “aislada” o “purificada” no tiene sustancialmente material genético u otras proteínas contaminantes de la célula o fuente de tejido de donde deriva la proteína, o no tiene sustancialmente precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

15 La expresión “sustancialmente libre de material genético” incluye las preparaciones de un polipéptido/proteína en donde el polipéptido/proteína se separa de los componentes celulares de las células de las que se encuentra aislado o producido por recombinación. Así, un polipéptido/proteína que sustancialmente no tiene material genético incluye preparaciones del polipéptido/proteína con menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2.5%, o 1%, (por peso en seco) de proteína contaminante. Cuando el polipéptido/proteína es producido de manera recombinada, preferiblemente tampoco tiene sustancialmente un medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación de proteína. Cuando un polipéptido/proteína se produce por síntesis química, preferiblemente no tiene sustancialmente precursores químicos u otros productos químicos, es decir, se separa de los precursores químicos u otros productos químicos que se implican en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, tales preparaciones del polipéptido/proteína tienen menos de aproximadamente un 30%, 20%, 10%, 5% (por peso en seco) de precursores químicos o compuestos aparte de fragmentos de polipéptido/proteína de interés. En una forma de realización preferida de la presente invención, los polipéptidos/proteínas son aislados o purificados.

25 Además de los polipéptidos anteriormente descritos, los polipéptidos de la invención también abarcan aquellos polipéptidos con una actividad biológica común y/o dominio estructural y que tiene identidad de aminoácido suficiente (homólogos) tal y como se define aquí. Estos homólogos pueden ser de la misma especie o especies diferentes de animales, preferiblemente de mamíferos, más preferiblemente de roedores, tales como el ratón y la rata, y preferiblemente de humano. Preferiblemente, muestran al menos una característica funcional y/o estructural de TREM-1, y son preferiblemente, capaces de tratar la sepsis, shock séptico o condiciones de tipo sepsis, por ejemplo actuando como antagonistas de la actividad del receptor TREM-1. Tales modificaciones incluyen la sustitución, delección y/o inserción de aminoácido. Las modificaciones de aminoácidos pueden ser realizadas por cualquier método conocido en la técnica y hay varios métodos disponibles y rutinarios para los expertos en la materia.

35 Adicionalmente, al hacer las sustituciones de aminoácidos, generalmente el residuo de aminoácido a sustituir puede ser una sustitución de aminoácido conservadora (es decir, “sustituido de manera conservadora”), por ejemplo, un residuo polar se sustituye por un residuo polar, un residuo hidrofílico por un residuo hidrofílico, un residuo hidrofóbico por un residuo hidrofóbico, un residuo cargado positivamente con un residuo cargado positivamente, o un residuo cargado negativamente con un residuo cargado negativamente. Por otra parte, en general, los residuos de aminoácidos a modificar no es muy conservada o completamente conservada entre especies y/o es fundamental para mantener la actividad biológica del péptido o la proteína que se deriva de éste.

45 Los péptidos de la invención pueden ser directamente sintetizados en cualquier vía conveniente. Generalmente los grupos reactivos presentes (por ejemplo amino, tiol y/o carboxilo) estarán protegidos durante la síntesis global. Una proporción de los péptidos de la invención, es decir, aquellos donde los aminoácidos comprendidos son aminoácidos genéticamente codificados, serán capaces de ser expresados en huéspedes eucarióticos y procarióticos por sistemas de expresión bien conocidos por el experto en la técnica. Los métodos para el aislamiento y purificación de por ejemplo, péptidos expresados microbianamente son también bien conocidos. Los polinucleótidos que codifican estos péptidos de la invención constituyen otros aspectos de la presente invención. Como se utiliza en este caso “polinucleótidos” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, en forma de un fragmento separado o como un componente de mayor construcción, por ejemplo un vector de expresión como por ejemplo un plásmido. Las secuencias polinucleótidas de la invención incluyen las secuencias de ADN, ARN y ADNc. Debido a la degeneración del código genético, por supuesto más de un polinucleótido es capaz de codificar un péptido particular según la invención. Cuando se elige el huésped bacteriano para la expresión de un péptido, puede ser necesario tomar medidas para proteger al huésped del péptido anti-bacteriano expresado. Tales técnicas se conocen en la técnica e incluyen el uso de una cepa bacteriana que es resistente al péptido particular expresado o la expresión de un péptido de fusión con secciones en una o ambas extremidades que deshabilitan la actividad antibiótica del péptido según la invención. En este caso, el péptido puede ser dividido después de cosecharlo para producir el péptido activo. Si el péptido incorpora una modificación química entonces la actividad/estabilidad del péptido expresado puede ser baja, y sólo se modula mediante una modificación química post-sintética.

65 Además, la invención también comprende derivados de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, pero no a modo limitativo, los derivados pueden incluir péptidos o proteínas que han sido modificados, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se pueden realizar por técnicas conocidas, incluyendo, no limitativamente, la escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no tradicionales.

ES 2 360 184 T3

Los expertos en la materia se percatarán de varios métodos para modificar péptidos para aumentar su fuerza, prolongar su actividad y/o vida media. En un ejemplo (WO0210195) la modificación se hace por enlace a través de enlace amina con al menos un sustituyente conformacionalmente rígido, ya sea en la terminal-X del péptido, en la terminal-C del péptido, o en el grupo que no tiene amino o carboxilo a lo largo de la cadena peptídica. Otros ejemplos de modificaciones peptídicas con efectos similares son descritos, por ejemplo, en la WO2004029081, WO03086444, WO03049684, WO0145746, WO0103723 y WO9101743.

También aquí descritos están los anticuerpos que comprenden un péptido o polipéptido de la invención o que imitan la actividad de los péptidos o polipéptidos de la invención. Tales anticuerpos incluyen, pero de forma no limitativa:, policlonales, monoclonales, bi-específicos, multi-específicos, humanos, humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, FVs enlazados por disulfuro, y fragmentos que contienen o bien un dominio LV o VH o incluso una región determinante complementaria (CDR) que se enlaza específicamente con un polipéptido de la invención. En otra forma de realización, los anticuerpos también pueden ser generados usando varios métodos de exposición en fago conocidos en la materia. Las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ pueden también ser empleadas usando métodos conocidos en la técnica tales como aquellos descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax, *et al.*, BioTechniques, 12(6):864-869, 1992; y Sawai, *et al.*, 1995, AJRI 34:26-34 ; y Better, *et al.*, 1988, Science 240:1041-1043.

Ejemplos de técnicas que pueden utilizarse para producir FVs monocatenario y anticuerpos incluyen aquellos descritos en las patentes estadounidenses Nos. 4,946,778 y 5,258,498; Huston, *et al.*, 1991, Methods in Enzymology 203:46-88; Shu, *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7995-7999; y Skerra, *et al.*, 1988, Science 240:1038-1040. Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que partes diferentes del anticuerpo se derivan de distintas especies animales, tales como anticuerpos con una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murina y una región constante derivada de una inmunoglobulina humana. Métodos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi, *et al.*, 1986, BioTechniques 4:214; Gillies, *et al.*, 1989, J. Immunol. Métodos 125:191-202; Patentes estadounidenses Nos. 5,807,715, 4,816,567; y 4,816,397.

Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que enlazan el antígeno deseado con una o más regiones determinantes complementarias (CDRs) de las especies no humanas y regiones tipo de una molécula de inmunoglobulina humana o en este caso, una o más CDRs derivadas de una proteína TREM-1. Como se conoce en la técnica, los residuos de estructura en las regiones humanas se pueden sustituir con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, mejorar preferiblemente, la unión del antígeno. Estas sustituciones de estructura se identifican por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de las CDR y los residuos de estructura para identificar residuos de estructura importantes para la unión del antígeno y la comparación de secuencias para identificar residuos de estructura inusuales en posiciones particulares. Véase, por ejemplo, Queen, *et al.*, Patente estadounidense No. 5,585,089; Riechmann, *et al.*, 1988, Nature 332:323, 1988. Los anticuerpos pueden ser humanizados usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, la inserción de CDR (EP 239,400; publicación PCT WO 91/09967; patentes estadounidenses Nos. 5,225,539, 5,530,101 y 5,585,089), enchapando o repavimentando (EP 592,106 ; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka, *et al.*, 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; Roguska, *et al.*, 1994, Proc Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, y la redistribución de cadena (Patente estadounidense n.º. 5,565,332).

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden ser hechos por una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de exposición en fago anteriormente descritos usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase las patentes estadounidenses Nos. 4,444,887 y 4,716,111; y publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741, los anticuerpos humanos pueden también ser producidos usando ratones transgénicos (véase Lonberg y Huszar (1995), Int. Rev. Immunol. 13:65-93). Para tratar detalladamente esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos humanos monoclonales y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n.º. 0 598 877; la patente estadounidense Nos. 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318, 5,885,793, 5,916,771; y 5,939,598. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA), Medarex (NJ) y Genpharm (San Jose, CA) se pueden comprometer para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la que hemos descrito anteriormente. Anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden ser generados usando una técnica a la que se refiere como "selección guiada". En este enfoque un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano reconociendo el mismo epítipo. (Jespers *et al.*, 1988, Bio/technology 12:899-903). Anticuerpos conjugados o fusionados a polipéptidos heterólogos se pueden utilizar en inmunoensayos *in vitro* y en métodos de purificación (p. ej., cromatografía de afinidad) bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación PCT número WO 93/21232; EP 439,095; Naramura, *et al.*, 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; Patente estadounidense 5,474,981; Gillies, *et al.*, 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1428-1432; y Fell, *et al.*, 1991, J. Immunol. 146:2446-2452.

ES 2 360 184 T3

También están aquí descritos los métodos para identificar un compuesto o ligando que une o modula la actividad o un polipéptido de la invención. Tal método comprende la medición de una actividad biológica del polipéptido en presencia o ausencia de un compuesto de prueba e identificar compuestos de prueba que alteran (aumentan o disminuyen) la actividad biológica del polipéptido.

En una forma de realización, la invención proporciona una proteína de fusión que comprende una molécula bioactiva y un polipéptido de la invención o derivados. En particular, la presente invención proporciona proteínas de fusión que comprenden una molécula bioactiva de recombinación fusionada o químicamente conjugada (incluyendo ambas conjugaciones no covalentes y covalentes) a un polipéptido de la invención o derivado.

La presente invención comprende además proteínas de fusión en las que los polipéptidos de la invención o derivados de los mismos, son fusionados de manera recombinante o químicamente conjugado (incluyendo tanto conjugaciones no covalentes como covalentes) a polipéptidos heterólogos (es decir, un polipéptido no relacionado o parte del mismo, preferiblemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos del polipéptido) para generar proteínas de fusión. La fusión no necesita forzosamente ser directa, pero puede ocurrir durante secuencias enlazadoras.

En un ejemplo, una proteína de fusión en la que un polipéptido de la invención o un derivado se puede fusionar en secuencias derivadas de varios tipos de inmunoglobulinas. Por ejemplo, un polipéptido de la invención se puede fusionar a una región constante (p. ej., bisagra, dominios CH2, y CH3) de la molécula humana IgG1 o IgM, (por ejemplo, como se describe por Hudson & Souriauso (2003) *Nature Medicine* 9(1):129-134) para lograr que los polipéptidos fusionados o fragmentos de los mismos *in vivo* sean más estables y solubles. La corta vida media de fragmentos de anticuerpos se puede también extender por “pegilación”, que es, una fusión a polietilenglicol (véase Leong, S.R. *et al.* (2001) *Cytokine* 16:106-119). En un ejemplo de tales fusiones, descrito en WO0183525, los dominios Fc se funden con péptidos biológicamente activos. Un compuesto farmacológicamente activo se produce conectando polivalentemente un dominio Fc a al menos un aminoácido de un péptido seleccionado. La conexión al vehículo aumenta la vida media del péptido, que de otra manera podría ser rápidamente degradado *in vivo*.

Alternativamente, los andamios de proteína de alternativa no tradicional (por ejemplo véase Nygren & Skerra (2004) *J Immunol Methods* 290(1-2):3-28 o WO03049684) pueden utilizarse para incorporar, y replicar las propiedades de, los péptidos de la invención, por ejemplo por secuencias peptídicas de inserción derivadas de TREM-1 CDR2 o CDR3 en una estructura de proteína para sostener bucles conformacionales variables con similitudes estructural/funcionales a CDR2 o CDR3 en una disposición espacial fija.

Tales proteínas de fusión o proteínas con base de andamios se pueden usar como un inmunógeno para la producción de anticuerpos específicos que reconocen los polipéptidos de la invención o fragmentos de los mismos. En otra forma de realización preferida, tales proteínas de fusión o proteínas a base de andamios se pueden administrar a un sujeto para inhibir interacciones entre un ligando y sus receptores *in vivo*. Tal inhibición de la interacción bloqueará o suprimirá determinadas respuestas celulares implicadas en sepsis y shock séptico.

En un aspecto, la proteína de fusión comprende un polipéptido de la invención que se fusiona a una secuencia señal heteróloga en su término-N. Varias secuencias señal están disponibles comercialmente. Por ejemplo, las secuencias secretoras de melitina y fosfatasa alcalina humana de placenta (Stratagene; La Jolla, CA) están disponibles como secuencias señal heterólogas eucarióticas. Como ejemplos de secuencias señal heterólogas procarrióticas, la señal secretora *phoA* (Sambrook, *et al.*, *supra*; y *Current Protocols in Molecular Biology*, 1992, Ausubel, *et al.*, eds., John Wiley & Sons) y la señal secretora de la proteína A (Farmacia Biotech; Piscataway, NJ) puede ser catalogada. Otro ejemplo es la secuencia secretora gp67 de la proteína de revestimiento de baculovirus (*Current Protocols in Molecular Biology*, 1992, Ausubel, *et al.*, eds., John Wiley & Sons).

En otra forma de realización, un polipéptido de la invención se puede fusionar a secuencias marcadoras, por ejemplo, un péptido de hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, estando muchos comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz, *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina se proporciona para una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros ejemplos de etiquetas peptídicas son la etiqueta de hemaglutina “HA”, que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutina de la gripe (Wilson, *et al.*, 1984, *Cell* 37:767) y la etiqueta “flag” (Knappik, *et al.*, 1994, *Biotechniques* 17(4):754-761). Estas etiquetas son especialmente útiles para purificar polipéptidos producidos recombinantemente de la invención.

Las proteínas de fusión se pueden producir por técnicas recombinantes de ADN estándar o por técnicas sintéticas de proteína, por ejemplo, usando un sintetizador peptídico. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión se puede sintetizar por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a unas preponderancias complementarias entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden posteriormente ser recocidos y reamplificados para generar una secuencia de genes quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1992, Ausubel, *et al.*, eds., John Wiley & Sons). La secuencia nucleótida que codifica para una proteína de fusión se puede insertar a un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia del código de proteínas insertada. Se conocen varios sistemas de vector de huésped y sistemas de selección. En una forma de realización específica, la

expresión de una proteína de fusión se regula por un promotor constitutivo. En otra forma de realización, la expresión de una proteína de fusión se regula por un promotor inducible. Conforme a estas formas de realización, el promotor puede ser un promotor tisular específico. Los vectores de expresión conteniendo insertos de un gen que codifica una proteína de fusión se puede identificar por tres enfoques generales: (a) hibridación de ácido nucleico, (b) presencia o ausencia de funciones de gen “marcador”, y (c) expresión de secuencias insertadas. En el primer enfoque, la presencia de un gen que codifica una proteína de fusión en un vector de expresión se puede detectar por hibridación de ácido nucleico usando sondas que comprenden secuencias que son homólogas a un gen insertado que codifica la proteína de fusión. En el segundo enfoque, el sistema de vector/huésped recombinante puede ser seleccionado e identificado basándose en la presencia o ausencia de funciones de determinados genes “marcadores” (p. ej., actividad de timidina quinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpo de oclusión en baculovirus, etc.) provocadas por la inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión en el vector. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión se inserta en la secuencia del gen marcador del vector, los recombinantes que contienen el gen que codifica el inserto de la proteína de fusión se pueden identificar por la ausencia de la función de gen marcador. En el tercer enfoque, los vectores de expresión recombinantes se pueden identificar evaluando el producto genético (es decir, la proteína de fusión) expresado por el recombinante. Tales ensayos pueden estar basados, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales de la proteína de fusión en sistemas de ensayo *in vitro*, por ejemplo, la unión con un anticuerpo de proteína de antifusión. Para una producción a largo plazo y con rendimiento alto de proteínas recombinantes, se prefiere una expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente la proteína de fusión pueden ser creadas genéticamente. Mejor que usar vectores de expresión que contengan orígenes víricos de replicación, las células huéspedes se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiada (p. ej., promotor, intensificador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y una etiqueta seleccionable. Después de la introducción del ADN extranjero, las células creadas genéticamente se pueden permitir crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células se integren establemente en el plásmido en sus cromosomas y que lleguen a focos de forma que puedan ser a su vez clonados y expandidos en líneas celulares. Este método puede ser ventajosamente usado para crear genéticamente líneas celulares que expresan la proteína genética expresada de manera diferente o trayectoria. Tales líneas celulares creadas genéticamente pueden ser particularmente útiles en la selección y la evaluación de compuestos que afectan a la actividad endógena de la proteína genética expresada de manera diferente o trayectoria. Una vez una proteína de fusión de la invención ha sido producida por una expresión recombinante, se puede purificar con cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una proteína, por ejemplo, por cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el anticuerpo específico, y cromatografía de columna por tamaño), centrifugado, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

También se describe aquí, métodos para tratar un sujeto que sufre de sepsis, shock séptico o condiciones sépticas, administrando un péptido o polipéptido de la invención. En otra forma de realización, el modulador puede ser un anticuerpo que imita la actividad de un polipéptido de la invención. En particular, un método para tratar o mejorar la sepsis, el shock séptico o una condición séptica en un sujeto, que comprende: la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido o polipéptido de la invención a un sujeto está descrita. En tales métodos, el péptido o polipéptido administrado puede tener identidad de secuencia sustancial (es decir, al menos 80%) de secuencias SEQ ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 o 19, es SEC ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 o 19, o un derivado de SEC ID NOS: 3, 4, 6, 7, 16, 17, 18 o 19.

También se describe aquí un método para la prevención de sepsis, shock séptico o condiciones de tipo sepsis, administrando al sujeto un péptido o polipéptido de la invención. Los sujetos con riesgo de sepsis o shock séptico pueden ser identificados por, por ejemplo, cualquier diagnóstico o ensayos de pronóstico como se conoce en la técnica (para métodos de diagnóstico especialmente adecuados, véase la WO2004081233, Gibot *et al.* (2004) *Ann Intern Med.* 141(1):9-15 y Gibot *et al.* (2004) *N Engl J Med.* 350(5):451-8. Los agentes profilácticos aquí descritos, por ejemplo, pueden utilizarse para tratar un sujeto con riesgo de desarrollar trastornos tales como los previamente discutidos. Los métodos aquí descritos son aplicables a mamíferos, por ejemplo seres humanos, primates no humanos, ovejas, cerdos, vacas, caballos, cabras, perros, gatos y roedores, tales como ratón y rata. Generalmente, los métodos aquí descritos se deben usar con sujetos humanos.

Además, aquí se describe una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la presente invención o un anticuerpo o fragmentos de los mismos que imitan a un polipéptido de la invención. Los péptidos, polipéptidos y anticuerpos (también denominados en este caso como “compuestos activos”) se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Tales composiciones comprenden típicamente el péptido, proteína, o anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se utiliza en este caso la expresión “diluyente farmacéuticamente aceptable, portador o excipiente” está destinado a incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antifúngicas y antibacterianos, isotónico y retrasadores de la absorción, y similares, compatible con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes de las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia. Salvo en la medida en que cualquier medio de comunicación convencional o agente es incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones. Compuestos suplementarios activos pueden también ser incorporados en las composiciones.

ES 2 360 184 T3

También se describen aquí los métodos para composiciones farmacéuticas de preparación que contiene un péptido o un polipéptido de la invención. Tales composiciones pueden incluir agentes adicionales activos. Así, aquí se describen unos métodos para preparar una composición farmacéutica formulando un portador farmacéuticamente aceptable con un péptido o polipéptido de la invención y uno o más compuestos adicionales activos.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su destinada forma de administración. Algunos ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenoso, intradérmico, subcutáneo, transdérmico (tópico), transmucosal, intra-articular, intraperitoneal, e intrapleural, al igual que administración oral, inhalación, y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para ser inyectada, solución salina, aceites fijos, polilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiamina-tetracético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechas de vidrio o plástico.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones estériles acuosas (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones estériles inyectables o dispersiones. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen una solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF; Parsippany, NJ) o suero salino tamponado con fosfato (PBS). En cualquier caso, la composición debe ser estéril y debería ser fluida en la medida en que existe una inyectabilidad fácil con una jeringa. Debe estar estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservados para evitar una acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas derivadas adecuadas. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, usando un recubrimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y usando tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser conseguida por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser causada incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Soluciones estériles inyectables pueden ser preparadas incorporando el compuesto activo (p. ej., un polipéptido o anticuerpos) en la cantidad requerida en un solvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados arriba, según sea necesario, seguidos de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los otros ingredientes requeridos de aquellos mencionados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y secado por congelación que produce un polvo del principio activo, además de los ingredientes adicionales que se desee de una solución previamente filtrada estéril.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden incluir en cápsulas de gelatina o comprimidas en comprimidos. A los efectos de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se utiliza en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas. Aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante como la celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina, un excipiente, como el almidón o lactosa, un agente de desintegración, como el ácido algínico, Primogel, almidón o fécula de maíz, un lubricante, como estearato de magnesio o Sterotes, un deslizante, como el dióxido de silicio coloidal, un agente edulcorante, como la sacarosa o sacarina, o un agente aromatizante, como la menta, salicilato de metilo, o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se entregan en forma de aerosol desde un recipiente a presión o dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas como el dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medio transmucoso o transdérmico. Para la administración transmucosa o transdérmica, penetrantes adecuados para la barrera para ser penetrados se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales de bilis, y derivados ácidos fusídicos. La administración transmucosa se puede realizar a través del uso de sprays nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles, o cremas como se conoce generalmente en la técnica. Los compuestos pueden también ser preparados en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la depuración rectal.

En una forma de realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegen el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluyen implantes y sistemas de entrega microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables biocompatibles tales como acetato de

vinilo y etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Los materiales pueden también ser obtenidos comercialmente de suspensiones liposómicas de Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. (incluyendo liposomas destinados a células infectadas con anticuerpos monoclonales a antígenos víricos) pueden también ser usados como portadores aceptables farmacéuticamente. Estos se pueden preparar según los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense n°. 4,522,811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales u orales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se utiliza en este caso se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para que el sujeto sea tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. Las especificaciones para la unidad de las formas de dosificación se dictan y dependen directamente de las características únicas de la sustancia activa y el efecto terapéutico que se debe alcanzar, y las limitaciones inherentes en la materia de la composición como un compuesto activo para el tratamiento de las personas.

Tal y como se define aquí, una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína o polipéptido (es decir, una dosificación eficaz) varía de aproximadamente 0.001 a 30 mg/kg de masa corporal, preferiblemente aproximadamente 0.01 a 25 mg/kg de masa corporal, más preferiblemente aproximadamente 0.1 a 20 mg/kg de masa corporal, e incluso más preferiblemente aproximadamente 1 a 10 mg/kg, 2 a 9 mg/kg, 3 a 8 mg/kg, 4 a 7 mg/kg, o 5 a 6 mg/kg de masa corporal.

Para los anticuerpos, la dosificación preferida es 0.1 mg/kg a 100 mg/kg de masa corporal (generalmente 10 mg/kg a 20 mg/kg). Si el anticuerpo actúa en el cerebro, una dosificación de 50 mg/kg a 100 mg/kg es normalmente apropiada. Generalmente, los anticuerpos parcialmente humanos y anticuerpos completamente humanos tienen un tiempo de vida media más largo en el cuerpo humano que otros anticuerpos. Por consiguiente, las dosificaciones inferiores y la administración menos frecuente es frecuentemente posible. Las modificaciones como la lipidación pueden utilizarse para estabilizar anticuerpos y para mejorar la absorción y penetración de tejido (p. ej., en el cerebro). Un método para la lipidación de anticuerpos se describe en Cruikshank, *et al.*, 1997, J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology 14:193.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, paquete, o dispensador junto con instrucciones para su administración.

Aquí también se describe un kit que contiene un péptido o polipéptido de la invención, o un anticuerpo o fragmentos de los mismos que imitan a un polipéptido de la invención, preferiblemente con instrucciones para su uso, por ejemplo en el tratamiento de sepsis, shock séptico o condiciones de tipo sepsis.

Aquí también se describe un método para la identificación (o selección) de moduladores, es decir, compuestos candidatos o de prueba o agentes (p. ej., péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que imitan a un polipéptido de la invención o tienen un efecto inhibitorio o estimulador en, por ejemplo, la actividad de un polipéptido de la invención. En particular, descrito aquí hay un método de selección de compuestos o composiciones para tratar sepsis, shock séptico o condiciones de tipo sepsis, que comprende: proporcionar un péptido TREM-1; poner en contacto a un animal en un modelo de ligadura cecal y punción (o usando otro ensayo o modelo como el aquí descrito o conocido en la técnica) con el péptido TREM-1, determinar si había una modulación en la sepsis, por ejemplo donde un aumento en supervivencia indica que el péptido TREM-1 puede ser útil para tratar sepsis, shock séptico o condiciones de tipo sepsis.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son aplicables al aspecto de cada uno, *mutatis mutandis*.

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, con referencia a las figuras. Cualquier ejemplo que se encuentre fuera del alcance de la invención reivindicada se provee solamente para ayudar al experto en la técnica a comprender el campo técnico de los polipéptidos TREM-1, y su uso en el tratamiento y/o prevención de sepsis o shock séptico.

Descripción de las figuras

Figura 1A. Muestra una alineación de secuencia de los elementos de la familia de TREM-1 y TREM-2. TREM-1 humano fue alineado con TREM-1 de ratón y humano y TREM-2 de ratón usando la versión 1.74 de CLUSTAL W. Atribuciones de estructura secundaria corresponden a la estructura de TREM-1 humano publicada (flechas para cadenas β y cilindro para hélices α) (Radaev *et al.* (2003) Structure (Camb). Dec; 11(12):1527-35). Los residuos implicados en la formación de homo-heterodímero se muestran en blanco sobre un fondo negro. Los enlaces de disulfuro de producción de cisteína conservados para pliegue Ig de tipo V están en negrita. Los espacios se indican con (-), residuos idénticos con (*), similares con (: o .). Una región extendida de similitudes entre secuencias de TREM-1 humano y de ratón se muestra en recuadros con un fondo gris. Las secuencias de péptidos TREM-1 usadas aquí en los ejemplos están subrayadas.

ES 2 360 184 T3

Figura 1B. muestra un diagrama de cintas de la publicada estructura homodimérica TREM-1 (Kelker, *et al.* (2004) J Mol Biol. Sep 24; 342(4):1237-48). Los sitios de unión postulados que comprenden las regiones determinantes complementarias (CDRs) equivalentes de anticuerpos están en rojo.

5 Figura 2. muestra que la administración de péptidos TREM-1, 1 hora antes de LPS, reduce la muerte inducida por endotoxaemia. Los ratones BALB/c (10 por grupo) fueron inyectados intraperitonealmente con 200 μ g de LPS. Los péptidos TREM-1 P1, P2, P3, o P5 (200 μ l de una solución de 300 μ M por ratón) fueron inyectados intraperitonealmente 1 hora antes del LPS. La viabilidad de ratones fue monitoreada dos veces al día durante 7 días. Análisis estadísticos fueron realizados por la prueba Logrank. Los datos de los ratones de control representan curvas de supervivencia acumulativas de dos experimentos independientes realizados bajo condiciones idénticas.

15 Figura 3. muestra que el péptido TREM-1 P1 es capaz de reducir eficazmente la muerte inducida por endotoxemia cuando se inyecta 4 horas después del LPS. Los ratones BALB/c (10 por grupo) fueron inyectados intraperitonealmente con 200 μ g de LPS. El péptido TREM-1 P1, 200 μ l de una solución 300 μ M por ratón fue inyectado intraperitonealmente 1 hora antes o 4 horas después del LPS. La viabilidad de los ratones fue monitoreada dos veces por día durante 7 días. El análisis estadístico fue realizado con la prueba Longrank. Los datos de los ratones de control representan curvas de supervivencia acumulativas de dos experimentos independientes realizados bajo condiciones idénticas.

20 Figura 4. muestra que la administración de péptidos TREM-1, 4 horas después LPS, reduce la muerte inducida por endotoxaemia. Los ratones BALB/c (10 por grupo) fueron inyectados intraperitonealmente con 200 μ g de LPS. El péptido P1, 200 μ l de una solución de 150, 300 y 600 μ M por ratón (puntos) o P3, 200 μ l de una solución de 600 μ M por ratón (cuadrados rellenos) fueron inyectados intraperitonealmente 4 horas después del LPS. La viabilidad de los ratones fue monitoreada dos veces al día durante 7 días. El análisis estadístico fue realizado con la prueba Logrank.

25 Figura 5. muestra que el péptido TREM-1 P1 protege contra la ligadura cecal y punción (CLP).

30 La CLP fue inducida en los ratones C57BL/6 (15 por grupo) como se describe en Materiales y Métodos. Péptido P1 (puntos huecos) o péptido P3 (cuadrados rellenos) (200 μ l de una solución 600 μ M por ratón) fueron inyectados intraperitonealmente 5 y 24 horas después de inducir la CPL. La viabilidad de los ratones fue monitoreada dos veces al día durante 10 días. El análisis estadístico fue realizado con la prueba Logrank.

35 Figura 6. muestra que los péptidos P1, P2 y P5, pero no el péptido P3, inhiben la unión de TREM-1/IgG1 soluble a las células peritoneales exudadas TREM-1 ligando positivas. Se puede ver el análisis citofluorimétrico de las células peritoneales exudadas con 2 μ g/ml de TREM-1/hIgG1 de ratón en presencia de una solución de 500 μ M por ratón (línea fina), 100 μ M de solución por ratón (línea con puntos) o la ausencia (línea gruesa) de los péptidos. El histograma gris representa la inmunocoloración con IgG1 humano como un control.

40 Figura 7A. Muestra la liberación de sTREM-1 de monocitos cultivados después de la estimulación con LPS con y sin inhibidor de proteasas. La estimulación de LPS indujo la apariencia de una proteína 27-kD que fue específicamente reconocida por un mAb anti-TREM-1 (intercalación). Los niveles de sTREM-1 en el medio de cultivo acondicionado fueron medidos por la reflectancia de inmunodots. Los datos se muestran como media \pm SD (n=3).

45 Figura 7B. muestra la expresión de ARNm de TREM-1 en monocitos. Los monocitos cultivados fueron estimulados con LPS (1 μ g/ml) durante 0, 1 y 16 horas como se indica. LPS indujo la producción de ARNm de TREM-1 en 1 hora.

50 Figura 8A. Muestra la liberación de citoquinas y sTREM-1 de monocitos cultivados. Para la activación de la célula, los monocitos primarios fueron cultivados en 24 tejidos de cultivo de grasa inferior en presencia de LPS (1 μ g/ml). En algunos experimentos este estímulo fue proporcionado en combinación con P5 (10 a 100 ng/ml), péptido de control (10 a 100 ng/ml) o rIL-10 (500 U/ml). Para activar los monocitos a través de TREM-1, un agonista anti-TREM-1 mAb (10 μ g/ml) fue añadido como se indica. Sobrenadantes sin célula fueron analizados para la producción de TNF- α , IL-1 β y sTREM-1 por ELISA o inmunodot. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos se expresan como medias (SEM).

- 55 a: Medios
60 b: P5 10 ng/mL
65 c: Anti-TREM-1
70 d: LPS
75 e: LPS + Anti-TREM-1
80 f: LPS + P5 10 ng/mL
85 g: LPS + P5 50 ng/mL

ES 2 360 184 T3

h: LPS + P5 100 ng/mL

i: LPS + IL10

5 Figura 8B. muestra el efecto de P5 en la activación NF κ B. Los monocitos fueron cultivados durante 24 horas en presencia de LPS de *E. coli* (0111:B4, 1 μ g/mL), mAb anti-TREM-1 (10 μ g/mL) y/o P5 (100 ng/mL) como se indica y los niveles de NF κ B p50 y p65 fueron determinados usando un ensayo basado en ELISA. Los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos se expresan como medias de densidades ópticas (SEM).

10 Figura 9. muestra la acumulación de sTREM-1 en suero de ratones tratados con LPS. Los ratones BALB/C machos (20 a 23 g) fueron tratados con LPS (LD₅₀, intraperitonealmente). El suero fue evaluado para sTREM-1 por inmunodot. El suero sTREM-1 fue fácilmente detectable 1 hora después de la administración de LPS y fue mantenido en un nivel estable de 4 a 6 horas.

15 Figura 10A. muestra que el pretratamiento con P5 protege contra la letalidad de LPS en ratones. Ratones BALB/C machos (20 a 23 g) fueron agrupados de forma aleatoria (10 ratones por grupo) y tratados con un LD₁₀₀ de LPS. P5 (50 μ g o 100 μ g) o vector de control fue administrado 60 min antes del LPS.

20 Figura 10B. muestra que una administración retardada de P5 evita la letalidad de LPS en ratones. Los ratones BALB/C machos (20 a 23 g) fueron agrupados aleatoriamente (8 ratones por grupo) y tratados con un LD₁₀₀ de LPS. El P5 (75 μ g) o vector de control fue administrado 4 o 6 horas después del LPS como indicado.

25 Figura 10C. muestra que la administración del agonista TREM-1 mAb es letal en ratones. Los ratones BALB/C machos (20 a 23 g) fueron aleatoriamente agrupados (8 ratones por grupo) y tratados con una combinación de un LD₅₀ de LPS + vector de control, LD₅₀ de LPS + anti-TREM-1 mAb (5 μ g) o LD₁₀₀ de LPS + un vector de control como se indica. El vector de control y anti-TREM-1 mAb fueron administrados 1 hora después de la inyección de LPS.

30 Figura 11A. muestra que P5 protege parcialmente a los ratones de la letalidad inducida por CLP. Los ratones BALB/C machos (20 a 23g) fueron agrupados aleatoriamente y tratados con solución salina normal (n=14) o el péptido de control (n=14, 100 μ g) o con P5 (100 μ g) en una única infección en H0 (n=18), H+4 (n=18) o H+24 (n=18). El último grupo de ratones (n=18) fue tratado con inyecciones repetidas de P5 (100 μ g) en H+4, H+8 y H+24.

35 Figura 11B. muestra el efecto de dosis de P5 en la supervivencia. Los ratones (n=15 por grupo) fueron tratados con una única inyección de solución salina normal o 10 μ g, 20 μ g, 50 μ g 100 μ g o 200 μ g de P5 de H0 después del CLP y monitoreados para la supervivencia.

40 Figura 12. muestra que P5 no tiene efectos en cuentas bacterianas durante CLP. Los ratones (5 por grupo) fueron matados bajo los efectos de una anestesia 24 horas después de CLP. Las cuentas bacterianas del fluido de lavado peritoneal y la sangre fueron determinados y los resultados se expresan como CFU por mL de sangre y CFU por ratón para el lavado peritoneal.

Figura 13 muestra la evolución de concentración en plasma de TNF- α y IL-1 β después de la administración de LPS (15 mg/kg) en ratas.

45 * p<0.05 animales tratados con P5 vs animales de control

§ p<0.05 animales tratados con P5 vs tratados con P1.

50 Figura 14 muestra la evolución de las concentraciones de nitrito/nitrato tras la administración de LPS (15 mg/kg) en ratas. p<0.05 tratados con P15 vs animales de control y tratados con P1.

Figura 15 muestra la evolución de la presión arterial media durante la ligación y punción cecal y la peritonitis inducida en ratas.

55 * p<0.05 vs animales de control.

Figura 16 muestra la evolución de concentración en plasma de TNF- α durante la ligación y punción cecal y la peritonitis inducida en ratas.

60 * p<0.05 tratados con P5 vs animales de control

§ p<0.05 tratados con P5 vs animales de control

65 § p<0.05 animales tratados con P1 vs P5.

Figura 17 muestra la evolución de la concentración de nitrito/nitrato durante la ligación y punción cecal y la peritonitis inducida en ratas.

* $p < 0.05$ animales tratados con P1 y P5 vs animales de control.

Ejemplo 1

Los péptidos TREM-1 protegen a los ratones de morir por shock séptico

Los péptidos TREM-1 que coinciden el siguiente criterio fueron sintetizados: i) homología máxima entre TREM-1 humano y ratón y homología mínima con TREM-2. ii) los péptidos que abarcan las regiones determinantes complementarias (CDRs) de TREM-1. Según la estructura cristalina publicada de TREM-1, y en analogía con los anticuerpos, estos residuos pueden estar implicados en el reconocimiento de ligando cognado (Radaev *et al.* (2003) *Structure* (Camb).Dec;11(12):1527-35 & Kelker, *et al.* (2004) *J Mol Biol.* Sep 24;342(4):1237-48) (véase la figura 1). Un péptido (P1) fue diseñado en la región CDR2 y tres péptidos (P2, P4 y P5) en la región CDR3. Un cuarto péptido (P3) fue diseñado en la región del cuello que conecta el dominio de tipo (Ig) (Ig-V) de la inmunoglobulina de tipo V al dominio de la transmembrana. Ningún péptido fue diseñado en la región CDR1 debido a la alta homología secuencial entre el TREM-1 y TREM-2.

Así, los siguientes péptidos de la proteína TREM-1 fueron ordenados y fueron sintetizados y purificados por la Sección de Química de Proteínas y Péptidos, Instituto de Bioquímica, Universidad de Lausana.

P1	(CDR2 67-89)	LWTQRPFTRPSEVHMGKFTLKH	[SEC ID N°:3]
P2	(CDR3 114-136)	VIYHPPNDPWLHPVRLVVTKG	[SEC ID N°:4]
P3	(región de cuello 168-184)	TTTRSLPKPTAWSSPG	[SEC ID N°:5]
P4	(CDR3 103-123)	LQVTDGLYRCVIYHPPNDPV	[SEC ID N°:6]
P5	(CDR3 103-119):	LQVTDGLYRCVIYHPP	[SEC ID N°:7]
P1sc*	(P1 sec codificada)	LTPKHGQRSTHVTKFRVFEPVML	[SEC ID N°:8]
P5sc*	(P5 sec codificada.)	TDSRCVIGLYHPPQLQVY	[SEC ID N°:9]

* Esto es un péptido de control y efectivamente, no protege.

En los experimentos de este ejemplo, los péptidos fueron administrados en un volumen de 200 μ l de la molaridad de solución indicada. Para valorar la capacidad de los péptidos TREM-1 para proteger a los ratones de la endotoxemia inducida por LPS, los péptidos P1, P2, P3 y P5 (300 μ M) administrados por los Inventores 1 hora antes de una dosis letal de lipopolisacárido (LPS) (Figura 2). La letalidad fue monitoreada a lo largo del tiempo y comparada con animales que han recibido inyecciones de control de vehículo solo. La inyección P5 confiere una protección máxima, con un 90% de los animales todavía vivos 7 días después de la inyección de LPS, comparado con un 10% de ratones de control ($p < 0.001$). Un 60% de los ratones tratados con P1 y un 50% de los ratones tratados con P2 sobrevivieron a la endotoxemia comparado con un 10% de ratones de control ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente). Interesantemente, todos los ratones tratados con P3 murieron 4 días después de la inyección de LPS. Estos resultados indican que los péptidos que contienen secuencias de la parte extracelular de TREM-1 correspondiente al sitio de unión de ligandos putativos (CDR2 y CDR3) pueden proteger a los ratones de un impacto letal.

Para investigar si el tratamiento del péptido TREM-1 podría retrasarse hasta después de la administración de LPS, los Inventores inyectaron los péptidos 4 horas después de la inyección de LPS. Sólo en el caso de P1, este tratamiento retardado confirió una protección significativa contra una dosis letal de LPS (figura 3). Un 80% de los ratones inyectados con P1 4 horas después del LPS sobrevivieron a la endoxemia en comparación con un 60% de ratones tratados 1 h antes del LPS y 10% de ratones tratados con vehículo solo ($p < 0.001$ y $p < 0.01$ respectivamente). Así, P1 es eficaz incluso inyectado después del brote de endotoxemia. Ninguna muerte tardía tuvo lugar tras una semana, indicando que P1 no retrasó meramente la aparición de la letalidad por LPS, pero proporcionó una protección duradera. La administración de P1 confirió una protección máxima (80%) cuando se administró en 600 μ M ($p < 0.01$) y el nivel de protección descendió a un 50% en 300 μ M ($p < 0.05$) y a un 30% en 150 μ M comparado con un 20% de ratones de prueba, indicando un efecto que depende de la dosis de P1 (Figura 4). Los Inventores luego investigaron si P1 protege contra shock séptico en el modelo "CLP" (la ligadura y punción cecal es un modelo experimental de sepsis muy utilizado). Los ratones tratados con dos dosis de P1 en 5 y 24 horas después de CLP fueron protegidos de la muerte en comparación con ratones de control tratados ($p = 0.0791$) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. 40% de los ratones inyectados con P1 en 5 días después de CLP sobrevivieron en comparación con un 5% de ratones tratados con péptido P3. 10 días después de CLP, los ratones tratados estaban todavía vivos, indicando que P1 no solo retrasó la mortalidad, sino que también proporcionó una protección duradera (figura 5).

Ejemplo 2

El péptido TREM-1 P1 inhibe la unión de ratón soluble TREM-1/IaG a células positivas de ligando TREM-1

5 Entre los péptidos TREM-1 derivados evaluados en CLP, los péptidos P1, P2 y P5 demuestran una actividad de protección. Un posible mecanismo de acción podría ser la capacidad del péptido derivado de TREM-1 para interferir con la interacción de ligando de TREM-1/TREM-1. Refiriéndonos a esta cuestión los Inventores realizaron experimentos de competición en células positivas de ligando de TREM-1: PEC (células del exudado peritoneal) de ratones tratados con CLP.

10 Las células del exudado peritoneal (PEC) de ratones que sufren de una ligación y punción cecal y peritonitis inducida por (CLP) fueron sometidas a un análisis de citometría de flujo tras la incubación con IgG1 anti-humano conjugado con PE (Jackson Immunoresearch, Bar Harbor, USA). La competición con péptidos TREM-1 fue realizada por células de preincubación con las concentraciones indicadas de péptidos durante 45 minutos en hielo antes de añadir mTREM-1-IgG1.

15 Como se muestra en la figura 6, el péptido P1, derivado de la región CDR2 de mTREM-1, y los péptidos P2 y P5 que abarcan la región CDR3 inhiben la interacción de TREM-1 con su ligando en una manera que depende de la dosis. Por el contrario el péptido P3, derivado de la región del cuello de TREM-1 que conecta la parte tipo IgG al dominio de transmembrana fue inefectivo.

Ejemplo 3

25 *Estudios adicionales sobre la modulación de la respuesta inflamatoria en sepsis de murina por el péptido P5 de TREM-1*

Métodos

30 *Preparación de Monocitos de sangre periférica*

Diez mL de muestras de sangre periféricas fueron recogidas en EDTA-K de 5 donantes saludables voluntarios originados del personal de laboratorio. Después de la dilución en RPMI (Life Technologies, Grand Island, NY) v/v, la sangre fue centrifugada durante 30 min a temperatura ambiente sobre un gradiente Ficoll (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia) para aislar PBMC. Las células recuperadas sobre el gradiente fueron lavadas y contadas. Para provocar la depleción de las suspensiones de linfocitos, las células fueron luego colocadas en placas de cultivo de tejido de fondo plano de 24 pocillos (Corning, Corning, NY) en una concentración de 5×10^6 /mL y se permitió su adhesión durante 2 horas a 37°C. La suspensión de linfocitos resultante fue descartada y las células monocíticas adheridas fueron mantenidas en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C en un medio completo (RPMI 1640, 0.1 mM de piruvato de sodio, 2 mM de penicilina, 50 µg/mL de estreptomocina; Life Technologies) suplementado con un 10% de FCS (Invitrogen, Cergy, Francia).

Péptido TREM-1

45 Usando la secuencia humana TREM-1 en formato Gen-Bank, acceso #AF287008 y la secuencia TREM-1 de ratón #AF241219, un péptido "P5" (LQVTDSGLYRCVIYHPP; [SEC ID N°:7]; fue químicamente sintetizado como un péptido amidado terminalmente en C (Pepscan Systems, Lelystad Países Bajos). El péptido correcto se obtuvo en un rendimiento mayor al 99% y con masa medida de 1961 Da contra una masa calculada de 1962 Da y fue homogénea después de la purificación preparatoria, como se ha confirmado por la espectrometría de masas y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa analítica. Un péptido "P5sc" que contiene los mismos aminoácidos que el P5 pero en un orden de secuencia diferente (TDSRCVIGLYHPPLQVY; [SEC ID N°: 9]) fue sintetizado de forma similar y sirvió como "péptido de control".

55 *Estimulación in vitro de monocitos*

Para la activación, los monocitos fueron cultivados en presencia de LPS de *E. coli* (0111 :B4, 1 µg/mL, Sigma-Aldrich, La Verpillière, Francia). La viabilidad celular fue evaluada por exclusión del azul de tripano y midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa. En algunos experimentos, este estímulo fue dado en combinación con TNF- α (5 a 100 ng/mL, R&D Systems, Lille, Francia), IL-1 β (5 to 100 ng/mL, R&D Systems), rIFN- γ (hasta 100 U/mL, R&D Systems), rIL-10 (500 U/ml, R&D Systems) o hasta 100 ng/mL de P5 o péptido de control.

65 Para activar los monocitos a través de TREM-1, un anticuerpo monoclonal agonista anti-TREM-1 (R&D Systems) fue añadido de la siguiente manera: las placas de fondo plano prevestidas con 10 µg/mL de anti-TREM-1 por pocillo. Después de un lavado profundo en suero salino tamponado con fosfato (PBS), las suspensiones de monocito fueron añadidas a una concentración similar como se ha mencionado antes. Algunos experimentos fueron realizados en presencia de inhibidores de proteasa (PMSF and Protease Cocktail Inhibitor; Invitrogen). Los sobrantes líquidos

ES 2 360 184 T3

libres de la célula fueron evaluados para la producción de TNF- α y IL-1 β por ELISA según las recomendaciones del fabricante (BD Biosciences, San Diego, USA). En cuanto al efecto del P5 en la actividad de NF κ B en monocitos, un ensayo basado en ELISA fue realizado (BD Mercury™ Transfactor Kit, BD Biosciences). Los monocitos fueron cultivados durante 24 horas en presencia de LPS de *E. coli* (0111:B4, 1 μ g/mL), y/o un anticuerpo monoclonal agonista anti-TREM-1 (10 μ g/mL), y/o P5 (100 ng/mL). Luego se prepararon extractos de célula y los niveles de NF κ B p50 y p65 fueron determinados según las recomendaciones del fabricante. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los datos se expresan como medias (SEM).

10 *Identificación y cuantificación de liberación de sTREM-1*

Las suspensiones de monocitos primarias fueron cultivadas como se ha descrito anteriormente. Las células fueron tratadas con LPS de *E. coli* (0111 :B4, 1 μ g/mL) durante 24 horas a 37°C. Un medio de acondicionamiento de célula fue sometido a la técnica Western-Blot usando un anticuerpo monoclonal anti-TREM-1 (R&D Systems) para confirmar la presencia de material 27 kDa reconocido por anti-TREM-1. Los niveles de TREM-1 soluble fueron medidos evaluando la intensidad óptica de las bandas en inmunodots mediante un escáner de reflectancia y el Quantity One Quantitation Software (Bio-Rad, Cergy, Francia) según lo informado en otro lugar (18). La concentración soluble de TREM-1 de cada muestra fue determinada comparando las densidades ópticas de las muestras con referencia a curvas estándares generadas con TREM-1 purificado. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado. La sensibilidad de esta técnica permite la detección de niveles de sTREM-1 tan bajos como 5 pg/ml.

TREM-1 RT-PCR

25 El ARNm total fue extraído de los monocitos primarios cultivados en presencia de LPS usando un reactivo TRIzol (Invitrogen), y transcrito inverso usando Superscript RT II (Invitrogen) para generar ADNc. Las condiciones de RT-PCR usadas luego para todas las reacciones fueron de 94°C, 30s/65°C, 30s/68°C, 1 min durante 30 ciclos. La amplificación fue realizada con 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 2.0 U *Taq* polimerasa y 20 pM de cebadores oligonucleótidos 5' y 3' (Proligos, París, Francia).

30 Las secuencias de los pares de cebadores 5' y 3' usadas fueron las siguientes:

para TREM-1 (17)

35 TTGTCTCAGAACTCCGAGCTGC; [SEC ID N°:10]

y

GAGACATCGGCAGTTGACTTGG; [SEC ID N°:11]

40 para TREM-1 sv (19)

GGACGGAGAGATGCCCAAGACC; [SEC ID N°:12]

y

45 ACCAGCCAGGAGAATGACAATG; [SEC ID N°:13]

para β -actina (usado como amplicón de limpieza)

GGACGACATGGAGAAGATCTGG; [SEC ID N°:14]

50 y

ATAGTAATGTCACGCACGATTTCC; [SEC ID N°:15]

55 Los productos PCR fueron hechos fluir en geles de agarosa y visualizados por coloración de bromuro de etidio.

Endotoxemia inducida por LPS en ratones

60 Después de la aprobación por el comité ético local, ratones BALB/C machos (20 a 23g) fueron agrupados de forma aleatoria y tratados con LPS de *E. coli* intraperitonealmente (i.p.) en combinación con P5 (en 500 μ l solución salina normal) o vector de control antes o después del desafío de LPS. En algunos experimentos, 5 μ g de un anticuerpo monoclonal anti TREM-1 fue administrado i.p. una hora después de la inyección de LPS. La viabilidad de los ratones fue examinada cada hora, o los animales fueron sacrificados en intervalos regulares. Las muestras de suero fueron recogidas por punción cardiaca y evaluadas por TNF- α y IL-1 β por ELISA (BD Biosciences), y para niveles de sTREM-1 por inmunodot.

Modelo de sepsis polimicrobiana de CLP

Los ratones BALB/C machos (7 a 9 semanas, 20 a 23g) fueron anestesiados por administración i.p. de quetamina y xilazina con 0.2 mL de solución salina estéril sin pirógeno. El intestino ciego fue expuesto a través de una incisión de 1.0 cm de línea media abdominal y sometido a una ligadura de la mitad distal seguida de dos punzadas con una aguja G21. Una pequeña cantidad de deposición fue expulsada de las punzadas para asegurar la permeabilidad. El intestino ciego fue sustituido en la cavidad peritoneal y la incisión abdominal cerrada en dos capas. Después de la cirugía todos los ratones fueron inyectados s.c. con 0.5 ml de solución salina fisiológica para la regeneración fluida y s.c. cada 12 h con 1.25 mg (es decir, 50 $\mu\text{g/g}$) de imipenem. Los animales fueron agrupados de forma aleatoria y tratados con solución salina normal (n=14), el péptido de control (n=14, 100 μg) o P5 (100 μg) en una única inyección en H0 (n=18), H+4 (n=18) o H+24 (n=18). El último grupo de ratones (n=18) fue tratado con inyecciones repetidas de P5 (100 μg) a H+4, H+8 y H+24. Todos los tratamientos fueron diluidos en 500 μl de solución salina normal y administrados i.p. Los Inventores trataron después de determinar el efecto de varias dosis de P5. Con este propósito, los ratones (n=15 por grupo) fueron tratados con una única inyección de solución salina normal o 10 μg , 20 μg , 50 μg , 100 μg o 200 μg de P5 a H0 después del CLP y monitoreados para supervivencia. Cinco animales adicionales por grupo fueron matados bajo anestesia 24 horas después del CLP para la determinación de cuenta bacteriana y niveles de citocinas. El fluido de lavado peritoneal se obtuvo usando 2 mL de RPMI 1640 (Life Technologies) y se recogió sangre por punción cardíaca. Las concentraciones de TNF- α y IL-1 β en el suero fueron determinadas mediante ELISA (BD Bioscience). Para la evaluación de cuentas bacterianas, sangre y fluido del lavado peritoneal fueron colocados en placas en diluciones de logaritmos en serie en soja triptica suplementada con 5% placas de agar de sangre de oveja. Después de la colocación en placas, las placas de agar de soja tripticas fueron incubadas a 37°C aeróbicamente durante 24 horas, y anaeróbicamente durante 48 horas. Los resultados se expresan por CFU por mL de sangre y CFU por ratón para el lavado peritoneal.

Análisis estadísticos

sTREM-1 en suero y niveles de citocinas fueron expresados como media (\pm SD). La protección contra la letalidad de LPS por P5 fue evaluada comparando las curvas de supervivencia utilizando la prueba Log-Rank. Todos los análisis estadísticos fueron completados con Statview software (Abacus Concepts, Berkeley CA) y una prueba bilateral $P < 0.05$ fue considerada significativa.

Resultados

Una forma soluble de TREM-1 se libera por monocitos humanos cultivados después de la estimulación con LPS de *E. coli*.

Para identificar la liberación potencial de sTREM-1 *in vitro*, los inventores estimularon los monocitos humanos con LPS y analizaron el medio de cultivo acondicionado por SDS-PAGE. La estimulación de LPS indujo la aparición de una proteína de 27-kDa en una manera que depende del tiempo (figura 7A). El análisis de Western Blot reveló que esta proteína fue específicamente reconocida por un anticuerpo monoclonal dirigido contra el dominio extracelular de TREM-1 (figura 7A). La viabilidad celular no fue afectada en concentraciones de LPS que indujeron la presencia de sTREM-1 en un medio acondicionado, indicando que la liberación de TREM-1 no fue debida a la muerte de célula. De forma similar, tratamiento de los monocitos con inhibidores de proteasa no influenciaron la liberación de TREM-1 (figura 7A). Los niveles de ARNm de TREM-1 aumentaron en el tratamiento de LPS (figura 7B) mientras que los niveles de ARNm de TREM-1sv se mantuvieron indetectables. Esto sugiere que la liberación de TREM-1 puede estar vinculada a una transcripción aumentada del gen y no relacionada con la expresión de TREM-1sv. La estimulación de los monocitos durante 16 horas con TNF- α (5 a 100 ng/mL) o IL-1 β (5 a 100 ng/mL) indujo una liberación muy pequeña de TREM-1 en una manera dependiente de la dosis en la citocina. La estimulación con IFN- γ no indujo la liberación de TREM-1, incluso en concentraciones de hasta 100 U/mL.

La liberación asociada de LPS de citocinas proinflamatorias se atenúa con P5

Se observó una producción significativa de TNF- α y IL-1 β en el sobrenadante de monocitos cultivados con LPS. La producción de TNF- α y IL-1 β fue incluso más alta para las células cultivadas con TREM-1 mAb y LPS como se comparó con aquellas cultivadas con mAb o LPS solo (figura 8A). La liberación inducible de citocinas proinflamatorias fue significativamente inferior después de la estimulación de LPS cuando el medio fue suplementado con P5 o IL-10. El P5 reducido, en una manera dependiente de la concentración, la producción de TNF- α e IL-1 β de células cultivadas con LPS o con LPS y mAb y simultáneamente aumentó la liberación de sTREM-1 de células cultivadas con LPS. El péptido de control no presentó ninguna acción en la liberación de citocinas o sTREM-1 (datos no mostrado). En un asombroso contraste, IL-10 inhibió totalmente la liberación de TREM-1 y citocinas inflamatorias (figura 8A). Tanto la LPS como la TREM-1 mAb indujeron una activación fuerte de NF- κ B monocítico p50 y p65 y combinó una administración de LPS y TREM-1 mAb llevó a un efecto sinérgico. P5 inhibió la activación de NF- κ B inducida por el acoplamiento de TREM-1 pero no alteró el efecto del LPS (figura 8B).

ES 2 360 184 T3

Los niveles en suero de sTREM-1 en ratones tratados con LPS son aumentados

Para determinar si sTREM-1 fue librado sistémicamente durante la endotoxemia en ratones, los inventores midieron los niveles en suero de sTREM-1 después de la administración de LPS. sTREM-1 en suero fue fácilmente detectable 1 hora después de la administración de una dosis de LD₅₀ de LPS y se mantuvo a niveles estables altos de 4 a 6 horas después del tratamiento de LPS (figura 9).

El péptido TREM-1 "P5" protege a los ratones endotoxémicos de la letalidad

Los ratones tratados por una única dosis de P5 60 min antes de una dosis letal (LD₁₀₀) de LPS se salvaron de morir de una manera dependiente de la dosis (figura 10A). Para indagar si el tratamiento P5 podría retrasarse hasta después de la administración del LPS, los Inventores inyectaron P5 comenzando 4 o 6 horas después de la inyección de LPS. Este tratamiento retardado hasta 4 horas confirió una protección significativa contra una dosis de LD₁₀₀ de LPS (figura 10B). Ninguna muerte tardía tuvo lugar en más de una semana, indicando que P5 no retrasó meramente la aparición de letalidad de LPS, sino que también proporcionó una protección duradera. Los ratones de control desarrollaron todos letargo, piloerección, y diarrea antes de la muerte. En contraste, ratones tratados con P5 se mantuvieron bien activos y cuidados, no tenían diarrea, y estaban animados. Para clarificar el mecanismo por el que el P5 protegía a los ratones de letalidad por LPS, los Inventores determinaron los niveles en suero de TNF- α , IL-1 β y sTREM-1 de ratones endotoxémicos a 2 y 4 horas. En comparación con los controles, el pretratamiento por 100 μ g de P5 redujo niveles de citocinas en un 30% y aumentó los niveles de sTREM-1 al doble como se muestra en tabla 4:

TABLA 4

Concentraciones en suero de TNF- α , IL-1 β y sTREM-1 en ratones endotoxémicos

	TNF- α (ng/mL)		IL-1 β (ng/mL)		sTREM-1 (ng/mL)	
	H2	H4	H2	H4	H2	H4
Control	3.3 \pm 1.0	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	249 \pm 48	139 \pm 8
P5(100 μ g)	2.4 \pm 0.5	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	475 \pm 37	243 \pm 28

El acoplamiento de TREM-1 es letal en ratones

Para subrayar aún más el papel del acoplamiento del TREM-1 en la mortalidad mediada por LPS, los ratones fueron tratados con el agonista anti-TREM-1 mAb en combinación con la administración de una dosis de LD₅₀ de LPS. Esto indujo un aumento significativo en el índice de mortalidad, de un 50% a un 100% (figura 10C).

P5 protege a los ratones de la letalidad inducida por CLP

Para indagar el papel de P5 en un modelo más relevante de shock séptico, los Inventores realizaron experimentos de CLP (figura 11A). Los grupos de control comprendían ratones inyectados con una solución salina normal o con el péptido de control. En este modelo de sepsis polimicrobiana, P5 todavía confería una protección significativa contra la letalidad incluso cuando se administró tan tarde como 24 horas después de la aparición de la sepsis. De manera interesante, inyecciones repetidas de P5 tenían un efecto más favorable en la supervivencia (P<0.01). Hubo un efecto de respuesta a la dosis de P5 en la supervivencia (figura 11B) y en la producción de citocinas (tabla 5). P5 no tenía efecto sobre el aclaramiento bacteriano (figura 12).

TABLA 5

Concentraciones en suero de TNF- α , IL-1 β y sTREM-1 24 horas después del CLP

	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	sTREM-1 (ng/mL)
Péptido de control	105 \pm 12	841 \pm 204	52 \pm 3
Salina de control	118 \pm 8	792 \pm 198	35 \pm 5
P5 10 μ g	110 \pm 11	356 \pm 62	43 \pm 8
P5 20 μ g	89 \pm 10	324 \pm 58	58 \pm 8

ES 2 360 184 T3

	P5 50µg	24±6	57±11	93±10
	P5 100µg	20±3	31±3	118±12
5	P5 200µg	21±7	37±8	158±13

10 La sepsis ejemplifica un síndrome clínico complejo que resulta de un huésped nocivo o perjudicial para una infección severa. La sepsis se desarrolla cuando se amplifica y luego se desregula la respuesta al huésped inicial y apropiada para la infección sistémica (4, 5). Los neutrófilos y los monocitos/macrófagos expuestos al LPS, por ejemplo, se activan y liberan tales citocinas proinflamatorias como el TNF- α y IL-1 β . Generalmente se cree que la producción excesiva de estas citocinas contribuye al fallo multiorgánico que sufren los pacientes sépticos (20-23).

15 TREM-1 es una molécula recientemente identificada implicada en la activación monocítica y en la respuesta inflamatoria (12, 14). Pertenece a una familia relacionada con los receptores de célula NK que activan eventos de señalización de flujo descendente. Se ha demostrado que la expresión de TREM-1 en PNNs y monocitos/macrófagos se puede inducir por LPS (16, 17).

20 Como se describe en este caso, los Inventores demuestran que una forma soluble de TREM-1 fue librada de monocitos humanos cultivados después de una estimulación con LPS de *E. coli*. Tal forma soluble se detectó también en el suero de ratones endotoxémicos tan pronto como 1 hora después del desafío con LPS. Esto es consistente con la implicación de TREM-1 en fases muy tempranas de la respuesta inmunitaria innata a la infección (14, 15, 24). El mecanismo por el que se libera sTREM-1 no está claramente dilucidado pero parece estar relacionado con una transcripción aumentada del gen TREM-1. Sin embargo, a pesar de que la incubación con un cóctel inhibidor de proteasa no altera la liberación de sTREM-1, la escisión de la TREM-1 de la superficie de la membrana no puede ser totalmente excluida. De manera interesante, la estimulación de monocitos humanos con tales citocinas proinflamatorias como la TNF- α , IL-1 β o IFN- γ inducen una liberación muy pequeña de sTREM-1 a no ser que el LPS haya sido añadido como coestímulo. La expresión de una variante alternativa de empalme en ARNm de TREM-1 (TREM-1 sv) ha sido detectada en monocitos lo que se puede traducir en un receptor soluble (18) sobre la estimulación con fracción de pared celular de BCG de *Mycobacterium bovis* pero no de LPS (25). Esto se confirmó en este estudio dado que i) LPS no aumentó el nivel de TREM-1 sv en ARNm en monocitos y ii) sólo una proteína de 27 kDa fue librada por monocitos tras una estimulación por LPS y no la variante de 17.5-kDa.

35 Aunque su ligando natural no ha sido identificado (13, 14), el acoplamiento de TREM-1 en monocitos con un anticuerpo monoclonal agonista resultó en otro realce de producción de citocinas proinflamatorias, mientras que el P5 indujo una reducción de esta síntesis en una manera dependiente de la concentración, y IL-10 lo suprimió completamente.

40 Se considera que las citocinas inflamatorias, y especialmente el TNF- α , son deletéreas, aunque también poseen efectos beneficiosos en la sepsis (5) como se muestra por el grave problema de peritonitis en animales con respuestas deteriorada de TNF- α (9-11). Por otra parte, en ensayos clínicos, la inhibición de TNF- α aumentó la mortalidad (8). Finalmente, el papel del TNF- α en el aclaramiento de la infección ha sido subrayado por el hallazgo de que la sepsis es una complicación frecuente en enfermos de artritis reumatoide tratados con antagonistas de TNF- α (26).

45 El mecanismo por el que el P5 modula la producción de citocinas no está todavía claro. El P5 comprende la región determinante complementaria (CDR)-3 y la cadena β "F" del dominio extracelular de TREM-1. Éste contiene un residuo de tirosina que media la dimerización. Radaev *et al* postuló que el TREM-1 captura su ligando con sus regiones de bucle equivalentes de CDR (27). Así P5 podría perjudicar a la dimerización de TREM-1 y/o concurrir con el ligando natural de TREM-1. Por otra parte, el aumento de liberación de sTREM-1 de monocitos mediados por P5 podrían prevenir el acoplamiento de la membrana TREM-1, actuando el sTREM-1 como un receptor señuelo, como en el sistema de TNF- α (28, 29).

55 La activación del factor de transcripción NF- κ B es un paso crítico en la producción de citocinas inflamatorias de monocitos después de la exposición a estímulos bacterianos tales como el LPS (30, 31). Entre los variados dímeros NF- κ B/Rel, el heterodímero p65/p50 es la forma prototípica de NF- κ B inducible por LPS en monocitos (32). P5 anula la sobre-activación de NF- κ B de p65/p50 inducida por el acoplamiento de TREM-1. Esto puede al menos parcialmente explicar los efectos de P5 en la producción de citocinas y la protección de letalidad aquí mostrada que ocurre cuando el péptido fue inyectado una hora antes del shock séptico inducido por LPS, o incluso 4 horas después.

60 La endotoxemia es fácil de conseguir experimentalmente, pero imperfectamente adecuada para reproducir sepsis humana, mientras que la sepsis polimicrobiana inducida por CLP es un modelo más complejo pero mejor, que incluye el uso de la regeneración de fluido y antibióticos. Ésta fue así también usada en este estudio, y confirmó la protección que depende de la dosis proporcionada por P5, incluso cuando se administra tan tarde como 24 horas después de la aparición de la sepsis. No obstante el efecto favorable de P5 no se relacionó con un aclaramiento bacteriano mejorado.

Una dificultad en el uso de terapias inmunomoduladoras es que no es posible predecir el desarrollo de la sepsis, y, por lo tanto, los pacientes que reciben esos tratamientos frecuentemente ya han establecido bien la sepsis (6). Ya que P5 pareció ser eficaz incluso inyectado después del brote de sepsis, podría así constituir un tratamiento realista (24, 33).

5

En contraste, el acoplamiento de TREM-1 por un anticuerpo monoclonal agonista anti-TREM-1 medió un aumento espectacular del índice de mortalidad en ratones desafiados por LPS: esto además subraya el efecto perjudicial del acoplamiento TREM-1 durante un shock séptico.

10

El shock séptico experimental reproduce solo en parte la sepsis humana. De hecho, nuestro grupo ha mostrado recientemente que niveles significantes de sTREM-1 fueron liberados en el suero de pacientes crucialmente enfermos con pacientes de sepsis (34), siendo los niveles más altos observados en pacientes que sobrevivieron. Esto es consistente con nuestras conclusiones experimentales que indican que cuanto más importante sea la liberación de sTREM-1, más favorable será el resultado, y así sostienen, al menos teóricamente, el valor potencial de los péptidos solubles TREM como terapia de sepsis de post-aparición.

15

TREM-1 parece ser un jugador crucial en la respuesta inmunitaria inmediata desencadenada por la infección. En la fase temprana de la infección, neutrófilos y monocitos inician la respuesta inflamatoria debido al acoplamiento de receptores de reconocimiento de configuración por productos microbianos (3, 4). Al mismo tiempo, los productos bacterianos inducen la sobre-regulación y la liberación de sTREM-1. Cuando se reconoce un ligando desconocido, TREM-1 activa vías de señalización que amplifican estas respuestas inflamatorias, sobre todo en monocitos/macrófagos. La modulación de la señalización de TREM-1 reduce, aunque sin una inhibición completa, la producción de citocinas y protege a animales sépticos de una hiper-receptividad y de la muerte. La modulación del acoplamiento de TREM-1 con tal péptido como puede ser P5 puede ser una herramienta terapéutica adecuada para el tratamiento de sepsis, particularmente porque parece estar activo incluso después de la aparición de sepsis después de una agresión infecciosa.

25

Ejemplo 4

30

Estudios hemodinámicos en ratas sépticas tratadas con P1 y P5 y tratadas con LPS

El papel de los péptidos TREM-1 en otros modelos de shock séptico, fue investigado mediante la realización de experimentos en ratas con LPS y CLP (ligadura y punción cecal).

35

Materiales y métodos

Endotoxemia inducida por LPS

40

Los animales fueron agrupados de forma aleatoria (n=10-20) y tratados con LPS de *Escherichia coli* (O111:B4, Sigma-Aldrich, Lyon, Francia) i.p. en combinación con los péptidos TREM-1 o revueltos.

El modelo de sepsis polimicrobiano CLP

45

El procedimiento ha sido descrito en detalles en otro lugar (véase Mansart, A. *et al.* Shock 19:38-44 (2003)). Brevemente, las ratas (n=6-10 por grupo) fueron anestesiadas por administración i.p. de quetamina (150 mg/kg). El intestino ciego fue expuesto a través de una incisión de la línea media abdominal de 3.0-cm y sometido a una ligadura de la mitad distal seguida de dos punzadas con una aguja G21. Una pequeña cantidad de deposición fue expulsada de las punzadas para asegurar la permeabilidad. El intestino ciego fue sustituido en la cavidad peritoneal y la incisión abdominal cerrada en dos capas. Después de la cirugía, todas las ratas fueron inyectadas s.c. con 50 mL/kg de solución salina normal para la regeneración de fluido. Los péptidos TREM-1 o revueltos fueron luego administrados como se explica más arriba.

55

Mediciones hemodinámicas en ratas

Inmediatamente después de la administración de LPS al igual que 16 horas después de CLP, la presión arterial BP, (sistólica, diastólica y, media), el ritmo cardíaco, el flujo sanguíneo abdominal aórtico, y el flujo sanguíneo mesentérico fueron registrados usando un procedimiento descrito en otro lugar (véase Mansart, A. *et al.* Shock 19:38-44 (2003)). Brevemente, la arteria carótida izquierda y la vena yugular izquierda fueron canuladas con una tubería PE-50. La presión arterial BP fue continuamente monitoreada por un transductor de presión y un sistema grabador-amplificador (IOX EMKA Technologies, Paris, France). Las sondas perivasculares (Transonic Systems, Ithaca, NY) envuelven la aorta superior abdominal y la arteria mesentérica, permitieron controlar sus flujos respectivos mediante un flujómetro (Transonic Systems). Después de la última medición (4ª hora durante los experimentos de LPS y 24ª hora después de CLP), los animales fueron sacrificados por una dosis excesiva de sodio tiopental i.v.

65

Mediciones biológicas

La sangre fue consecutivamente retirada de la arteria carótida izquierda. Las concentraciones arteriales de lactato y el análisis de gases de sangre fueron realizadas en un analizador automático de gas sanguíneo (ABL 735, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). Las concentraciones de TNF- α y IL-1 β en el plasma fueron determinadas por un test ELISA (Biosource, Nivelles, Bélgica) según las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones plasmáticas de nitratos/nitritos fueron medidas usando la reacción de Griess (R&D Systems, Abingdon, GB).

10 *Análisis estadísticos*

Los resultados se expresan como media \pm SD. Comparaciones entre grupos fueron realizadas usando pruebas t de Student. Todos los análisis estadísticos fueron completados con el software Statview (Abacus Concepts, CA) y la prueba bilateral P<0.05 fue considerada significativa.

15

*Resultados*20 *Modelo de endotoxemia*

Después de la administración de LPS, las presiones arteriales, los flujos de sangre aórtico y mesentérico descendieron rápidamente en animales de control (ratas tratadas con péptidos revueltos) mientras que el ritmo cardíaco se mantuvo invariado (tabla 6). La reducción de presiones arteriales y flujo sanguíneo aórtico se retrasó hasta la segunda hora en animales tratados con péptido TREM-1 con valores significativamente más altos en ese tiempo que en los animales de control. No había ninguna diferencia entre los grupos tratados con P1 y P5. En contraste, ninguno de estos dos péptidos tuvo ningún efecto en la reducción del flujo sanguíneo mesentérico (tabla 6).

25

El pH arterial se mantuvo constante con el paso del tiempo hasta la cuarta hora después de la inyección de LPS en la que cayó severamente sólo en el grupo de control (tabla 6). La elevación del nivel de lactato arterial significativo presente en animales de control después de la tercera hora fue anulada por los péptidos TREM-1 (tabla 6). No hubo ninguna diferencia entre P1 y P5 acerca del pH, concentraciones arteriales de bicarbonato y de lactato.

30

Como se esperaba, un valor máximo de concentración plasmática de TNF- α fue inducido por LPS entre 30 minutos y 1 hora después de la inyección seguida de un descenso progresivo luego (figura 13A). La inyección de péptido P1 no tuvo efecto en esta producción, mientras que P5 atenuó la producción de TNF- α en ~30%.

35

P1 retardó el valor máximo de IL-1 β hasta la tercera hora después de la inyección de LPS, pero sin atenuación. En contraste, P5 redujo fuertemente la liberación de IL-1 β (figura 13B).

Las concentraciones de nitrito/nitrato aumentaron rápidamente después de la administración de LPS en animales de control y tratados con P1 pero se mantuvieron estables en el tratamiento de P5 (figura 14).

40

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 360 184 T3

TABLA 6

Parámetros hemodinámicos durante endotoxemia inducida por LPS

		Frecuencia cardíaca (bpm)	MAP (mmHg)	Flujo sangre aórtica (mL/min)	de Flujo sangre mesentérica (mL/min)	de pH	Lactato (mmol/L)
5							
10	Control	H0 486±13	123±21	45±7	13.6±3.4	7.31±0.03	3.3±0.8
		H1 522±16	103±25	25±8 ^a	9.6±3.3	7.28±0.03	4.2±0.3
15		H2 516±13	98±23	12±5 ^{a,b}	8.0±3.7	7.29±0.03	5.9±0.6
		H3 490±20	78±8 ^{a,b}	8±3 ^{a,b}	5.8±1.1	7.26±0.01	7.9±1.8 ^{a,b}
		H4 510±18	67±9 ^{a,b}	6±1 ^{a,b}	4.1±0.8	7.03±0.10 ^{a,b}	11.5±0.7 ^{a,b}
20	P1	H0 464±25	116±10	49±11	12.0±3.7	7.32±0.04	2.7±0.1
		H1 492±26	119±14	39±12 ^a	10.5±1.7	7.29±0.04	4.9±1.1
25		H2 492±26	113±21	26±14 ^a	7.7±2.7	7.30±0.01	5.0±0.9
		H3 480±30	97±29 ^a	22±8 ^a	5.0±1.0	7.26±0.06	5.7±0.7 ^a
		H4 480±20	92±7 ^a	16±6 ^a	4.8±0.9	7.26±0.08 ^a	7.9±1.7 ^a
30	P5	H0 474±49	115±16	48±9	12.8±6.4	7.33±0.04	3.4±1.5
		H1 498±26	99±22	32±8	11.4±2.7	7.28±0.06	5.4±1.4
35		H2 510±42	101±18	23±4 ^b	9.2±1.9	7.32±0.07	5.5±1.6
		H3 517±62	93±21 ^b	20±7 ^b	6.0±0.8	7.29±0.11	5.9±1.7 ^b
40		H4 510±26	89±10 ^b	15±6 ^b	5.0±1.0	7.28±0.12 ^b	7.4±1.8 ^b
	^a p<0.05 P1 vs Controles						
	^b p<0.05 P5 vs Controles						

45

Modelo CLP

50 Dado que la gravedad del modelo de los Inventores fue máxima de 16 a 20 horas después de la finalización de CLP, los Inventores escogieron investigar al animal en la 16^a hora. De manera importante, no hubo muertes antes de esta hora. Aunque el fluido de todos animales fue revitalizado, ninguno recibió antibióticos para considerar estrictamente el papel de los péptidos.

55 Hubo un descenso dramático de la presión arterial en los animales de control con el paso del tiempo, y por presiones arteriales sistólica H24, diastólica y media fueron 58±7 mmHg, 25±4 mmHg y 38±2 mmHg respectivamente. Esta reducción fue casi totalmente anulada con el tratamiento de P1 o P5 sin diferencias significantes entre H16 y H24 (figura 15). No hubo diferencia entre ratas tratadas con P1 y P5.

60 Los péptidos TREM-1 también evitaron la reducción de flujos sanguíneos aórticos y mesentéricos observados en animales de control (tabla 7). El efecto de protección en alteraciones de flujo sanguíneo mesentéricas fue incluso mayor bajo el tratamiento de P5. La conservación relativa de flujos de sangre no se relacionó con un ritmo cardíaco aumentado, puesto que éste fue más bien más lento que en animales de control (tabla 7).

65 La acidosis metabólica progresiva que se desarrolló en ratas de control fue atenuada por el péptido P1, y casi revocada por P5. La misma tendencia de protección fue observada para la elevación de lactato arterial con un efecto más pronunciado de P5 (tabla 7).

ES 2 360 184 T3

TABLA 7

Parámetros bioquímicos hemodinámicos y seleccionados durante la sepsis polimicrobiana de CLP

		Frecuencia cardíaca (bpm)	Flujo sangre aórtica (mL/min)	de Flujo de sangre mesentérica (mL/min)	de pH	Bicarbonato (mmol/L)	Lactato (mmol/L)
5							
10	Control	H16 516±44 ^{a,b}	38±10	10.6±3.0 ^b	7.31±0.07 ^b	16.9±2.7	4.7±1.5 ^b
		H20 543±35 ^{a,b}	19±11 ^{a,b}	4.3±1.5 ^b	7.23±0.05 ^{a,b}	12.0±5.6 ^{a,b}	8.5±1.4 ^{a,b}
15		H24 480±20	14±9 ^{a,b}	2.5±0.7 ^b	7.17±0.01 ^{a,b}	10.3±3.3 ^a	10.8±1.9 ^{a,b}
	P1	H16 462±16 ^a	41±12	13.5±7.2	7.32±0.04	16.8±4.4	4.9±0.4
20		H20 480±30 ^a	28±17 ^a	5.3±3.0 ^c	7.31±0.18 ^a	16.0±5.4 ^b	5.3±1.1 ^{a,c}
		H24 420±30	22±16 ^a	4.5±2.1 ^c	7.24±0.06 ^{a,c}	11.2±0.8 ^c	6.8±0.9 ^{a,c}
25	P5	H16 460±17 ^b	41±14	15.3±3.5 ^b	7.35±0.01 ^b	18.6±2.0	3.3±0.4 ^b
		H20 500±17 ^b	31±5 ^b	11.0±6.9 ^{b,c}	7.34±0.01 ^b	18.0±0.9 ^a	3.6±0.9 ^{b,c}
		H24 510±20	28±8 ^b	8.5±3.5 ^{b,c}	7.36±0.01 ^{b,c}	17.1±0.9 ^{a,c}	4.9±1.1 ^{b,c}
30	^a p<0.05 P1 vs Controles						
	^b p<0.05 P5 vs Controles						
	^c p<0.05 P5 vs P1						

35 Tanto P1 como P5 indujeron una reducción en la producción de TNF- α , nuevamente con un efecto más fuerte de P5. Por H20, el TNF- α plasmático fue casi indetectable bajo el tratamiento con P5 mientras que se mantuvo elevado en los otros grupos de animales (figura 16).

40 Las concentraciones de nitrito/nitrato se aumentaron en animales de control pero se mantuvo a un nivel bajo en ambos grupos tratados con péptidos TREM-1 (figura 17).

45 Una acción de protección de ambos P5 y P1 en hemodinámica fue así observada en ratas sépticas. Tanto la tensión arterial como los flujos de sangre se conservaron, independientemente del ritmo cardíaco. Por otra parte, la modulación de señalización de TREM-1 redujo, aunque no completamente, la producción de citocinas y protegió a los animales sépticos de una hiper-receptividad. El hecho de que la producción de citocinas no fue totalmente inhibida es un punto crucial. De hecho, aunque citocinas inflamatorias tales como TNF- α son consideradas deletéreas, también muestran efectos beneficiosos en sepsis como se ha subrayado por el grave problema de los modelos de peritonitis en animales con respuestas de TNF- α perjudicadas.

50 La activación de iNOS observada durante el shock séptico lleva a la producción de gran cantidad de NO que explica parcialmente algunos de los trastornos periféricos vasculares (sobre todo vasodilatación e hipotensión). En el miocardio mismo, la mayor parte de la acción de NO se media por una activación de la guanilato-ciclasa soluble responsable de la producción de cGMP que perjudica el efecto de calcio citosólico en la contracción. El GMP cíclico es también capaz de estimular la actividad de algunas fosfodiesterasas. La reducción posterior de niveles cAMP intracelulares podrían explicar la capacidad de NO para atenuar los efectos de estimulación adrenérgica beta. La conservación de la presión arterial podría por lo tanto ser parcialmente explicada por una producción disminuida de NO, como reflejan las concentraciones inferiores de nitrito/nitrato en plasma en animales tratados con péptidos TREM-1.

60 La reducción en la producción de citocinas inflamatorias podría parcialmente explicar el efecto notado en flujos de sangre. De hecho, aunque la lista de mediadores de depresión de citocinas potenciales de miocardio es larga, se ha demostrado que el TNF- α e IL-1 β son buenos candidatos. Estas últimas citocinas redujeron la contractilidad del miocardio *in vitro* o *ex vivo*. Por otra parte, la neutralización o eliminación de TNF- α o IL-1 β del suero séptico humano revoca parcialmente el efecto depresor del miocardio *in vitro* e *in vivo*. Aunque P1 y P5 tuvo una acción idéntica en flujos de sangre y presión arterial durante la endotoxemia, su acción en la producción de citocinas difirió con sólo un efecto ligero de P1 en concentraciones en plasma de TNF- α e IL-1 β . El papel de protección de los péptidos TREM-1 podría por lo tanto estar sólo parcialmente relacionado con su acción en liberación de citocinas, o implicar trayectorias redundantes.

La modulación de la trayectoria de TREM-1 por el uso de péptidos pequeños sintéticos tiene efectos beneficiosos en parámetros hemodinámicos durante el shock séptico experimental en ratas, con una atenuación de producción de citocinas inflamatorias.

5 En resumen, estos datos muestran que los péptidos TREM-1 1) protegen eficazmente a los animales sometidos de deterioro hemodinámico relacionado con la sepsis; 2) atenúan el desarrollo de acidosis láctica; 3) modulan la producción de tales citocinas proinflamatorias como TNF- α y IL-1 β y 4) reducen la generación de óxido nítrico. Así los péptidos TREM-1 son potencialmente útiles en la restauración de parámetros hemodinámicos en pacientes con sepsis, shock séptico o condiciones tipo sepsis y por lo tanto constituyen un tratamiento potencial para las condiciones
10 mencionadas.

1. **Aderem, A.**, and **R.J. Ulevitch, R.J.** 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-786.

15 2. **Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M.T. Ochoa, P.A. Engele, P.A. Sieling, P.F. Barnes, M. Rollinghoff, P.L. Bolcskei,** and **M. Wagner.** 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptors. *Science* 291:1544-1549.

3. **Medzhitov, R.,** and **C Jr. Janeway.** 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343:338-344.

4. **Cohen, J.** 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885-91.

5. **Hotchkiss, R.S.,** and **I.E. Karl.** 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 348:138-50.

6. **Vincent, J.L., Q. Sun,** and **M.J. Dubois.** 2002. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin. Infect. Dis.* 34:1084-1093.

7. **Riedemann, N.C., R.F. Guo,** and **P. Ward.** 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* 9:517-524.

8. **Fisher, C.J. Jr., J.M. Agosti, S.M. Opal, S.F. Lowry, R.A. Balk, J.C. Sadoff, E. Abraham, R.M. Schein,** and **E. Benjamin.** 1996. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N. Engl. J. Med* 334:1697-702.

9. **Echtenacher, B., W. Falk, D.N. Mannel,** and **P.H. Krammer.** 1990. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J. Immunol.* 145:3762-3766.

10. **Echtenacher, B., K. Weigl, N. Lehn,** and **D.N. Mannel.** 2001. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect. Immun.* 69:3550-5.

11. **Eskandari, M.K., G. Bolgos, C. Miller, D.T. Nguyen, L.E. DeForge,** and **D.G. Remick.** 1992. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J. Immunol.* 148:2724-30.

12. **Bouchon, A., J. Dietrich,** and **M. Colonna.** 2000. Inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J. Immunol.* 164:4991-4995.

13. **Colonna, M.,** and **F. Facchetti.** 2003. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J. Infect. Dis.* 187 (Suppl): S297-301.

14. **Colonna, M.** 2003. TREMs in the immune system and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 6:445-453.

15. **Nathan, C.,** and **A. Ding.** 2001. TREM-1: a new regulator of innate immunity in sepsis syndrome. *Nat. Med.* 7: 530-2.

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

17. **Bleharski, J.R., V. Kiessler, C. Buonsanti, P.A. Sieling, S. Stenger, M. Colonna,** and **R.L. Modlin.** 2003. A role for Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J. Immunol.* 170:3812-3818.

18. **Gibot, S., A. Cravoisy, B. Levy, M.C. Béné, G. Faure,** and **P.E. Bollaert.** 2004. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 350:451-8.

19. **Gingras, M.C., H. Lapillonne,** and **J.F. Margolin.** 2001. TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Mol. Immunol.* 38:817-24.

20. **Dinarello, C.A.** 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112 (suppl): S21-9.
- 5 21. **Bone, R.C., R.A Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, W.A. Knauss, R.M. Schein, and W.J. Sibbald.** 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644-55.
- 10 22. **Warren, H.S.** 1997. Strategies for the treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 336:952-3.
23. **Stone, R.** 1994. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 264:365-7.
24. **Cohen, J.** 2001. TREM-1 in sepsis. *Lancet* 358:776-8.
- 15 25. **Begun, N.A., K. Ishii, M. Kurita-Taniguchi, M. Tanabe, M. Kobayashi, Y. Moriwaki, M. Matsumoto, Y. Fukumori, I. Azuma, K. Toyoshima, and T. Seya.** 2004. *Mycobacterium bovis* BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cADN subtraction in human macrophages. *Infect. Immun.* 12:937-48.
- 20 26. **Keane, J., S. Gershon, R.P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W.D. Schwieterman, J.N. Siegel, and M.M. Braun.** 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 345:1098-104.
- 25 27. **Radaev, S., M. Kattah, B. Rostro, M. Colonna, and P. Sun.** 2003. Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1. *Structure* 11:1527-35.
28. **Lantz, M., U. Gullberg, and E. Nilsson.** 1990. Characterization *in vitro* of a human tumor necrosis factor binding protein. A soluble form of tumor necrosis factor receptor. *J. Clin. Invest.* 86:1396-1401.
- 30 29. **van Zee, K.J., T. Kohno, and E. Fischer.** 1992. Tumor necrosis soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4845-4853.
- 35 30. **Collart, M.A., P. Baeuerle, and P. Vassalli.** 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages. Involvement of four NF κ B motifs and constitutive and inducible form of NF κ B. *Mol. Cell Biol.* 10:1498-506.
- 40 31. **Hiscott, J.M., J.J. Garoufalidis, A. Roulston, I. Kwan, N. Pepin, J. Lacoste, H. Nguyen, G. Bensi, and M. Fenton.** 1993. Characterization of a functional NF κ B site in the human IL-1 β promoter: evidence for a positive auto-regulatory loop. *Mol. Cell Biol.* 13:6231-40.
- 45 32. **Urban, M.B., R. Schreck, and P.A. Baeuerle.** 1991. NF κ B contacts ADN by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J.* 10:1817-25.
33. **Lolis, E., and R. Bucala.** 2003. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2:635-45.
- 50 34. **Gibot, S., M.N. Kolopp-Sarda, M.C. Béné, A. Cravoisy, B. Levy, G. Faure, and P.E. Bollaert.** 2004. Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann. Intern. Med.* 141:9-15.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido o derivado, que es capaz de actuar como antagonista de la proteína TREM-1 tal y como se define en SEC ID N° 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20 o al menos 3 aminoácidos de la SEC ID N°: 21, donde:

(a) el polipéptido consiste en:

(i) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 1 o

(ii) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 1 en la que un aminoácido se sustituye de forma conservadora con otro aminoácido;

o

(b) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°s: 16, 17, 18 o 19;

y donde los derivados de los polipéptidos de (a) o (b) se modifican por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, o derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos.

2. Polipéptido o derivado según la reivindicación 1 que consiste en:

(i) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 1 o

(ii) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 1 en la que un aminoácido se sustituye de forma conservadora por otro aminoácido;

y donde los derivados de los polipéptidos de (i) o (ii) se modifican por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, o derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos.

3. Polipéptido o derivado según la reivindicación 1 donde el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°s: 16, 17, 18 o 19;

y donde los derivados del polipéptido se modifican por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, o derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos.

4. Polipéptido o un derivado según la reivindicación 3 donde el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°: 19.

5. Polipéptido o derivado según la reivindicación 3 donde el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a la secuencia de SEC ID N°s: 16, 17, 18 o 19, y que difiere de dichas secuencias sólo por modificaciones conservadoras.

6. Polipéptido según la reivindicación 4 donde el polipéptido consiste en un aminoácido con al menos un 80% de identidad de secuencia a la secuencia de SEC ID N°: 19, y que difiere de dicha secuencia sólo por modificaciones conservadoras.

7. Polipéptido según la reivindicación 1 o 2, donde dicho polipéptido consiste en una secuencia contigua de 15-29 aminoácidos de SEC ID N° 1.

8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7 que contiene al menos 3 aminoácidos de SEC ID N° 21, donde al menos 3 aminoácidos de SEC ID N° 21 son QPP, QPPK o QPPKE.

9. Polipéptido o derivado según la reivindicación 5, donde el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácidos con la secuencia de SEC ID N°s: 16, 17, 18 o 19.

10. Polipéptido o un derivado, que es capaz de actuar como antagonista de la proteína TREM-1 tal y como se define por SEC ID NO.2, que comprende SEC ID n°. 22 o al menos 3 aminoácidos de SEC ID N°. 23, donde:

(a) el polipéptido consiste en:

(i) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 2; o

ES 2 360 184 T3

(ii) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 2 en la que un aminoácido se sustituye de forma conservadora por otro aminoácido;

o

(b) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°S: 3, 4, 6 o 7;

y donde los derivados de los polipéptidos de (a) o (b) se modifican por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, o derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos.

11. Polipéptido o derivado según la reivindicación 10 donde el polipéptido consiste en:

(i) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 2 o

(ii) una secuencia contigua de 15 a 29 aminoácidos de SEC ID N°: 2 en la que un aminoácido se sustituye de forma conservadora por otro aminoácido;

y donde los derivados de los polipéptidos de (i) o (II) modificados por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, o derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos.

12. Polipéptido o derivado según la reivindicación 10 donde el polipéptido consiste en una secuencia de aminoácido con al menos un 80% de identidad de secuencia a SEC ID N°S: 3, 4, 6 o 7;

y donde los derivados del polipéptido se modifican por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, o derivatización por grupos de protección/bloqueo conocidos.

13. Polipéptido según la reivindicación 10 u 11, donde dicho polipéptido consiste en una secuencia contigua de 15-29 aminoácidos de SEC ID N°: 2.

14. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 13 que contiene al menos 3 aminoácidos de SEC ID N°: 23, donde al menos 3 aminoácidos de SEC ID N°: 23 son HPP, HPPN o HPPND.

15. Polipéptido que es una proteína de fusión que consiste en un polipéptido o derivado según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 13 y un polipéptido heterólogo seleccionado del grupo que consiste en una secuencia derivada de una inmunoglobulina, andamios de proteína alternativos no tradicionales, secuencias señal heterólogas fusionadas al término N del polipéptido o derivado, y secuencias marcadoras.

16. Polipéptido o derivado según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 15 **caracterizado** por su capacidad para tratar sepsis o shock séptico.

17. Polinucleótido aislado capaz de codificar un polipéptido o derivado de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16.

18. Vector que contiene un polinucleótido según la reivindicación 17.

19. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido o derivado según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16.

20. Polipéptido o derivado según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16 para ser utilizado en terapia.

21. Polipéptido o derivado según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16 para ser utilizado en el tratamiento de sepsis o shock séptico.

22. Uso del polipéptido o derivado según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 16 en la producción de un medicamento para el tratamiento de sepsis o shock séptico.

Figura 1A

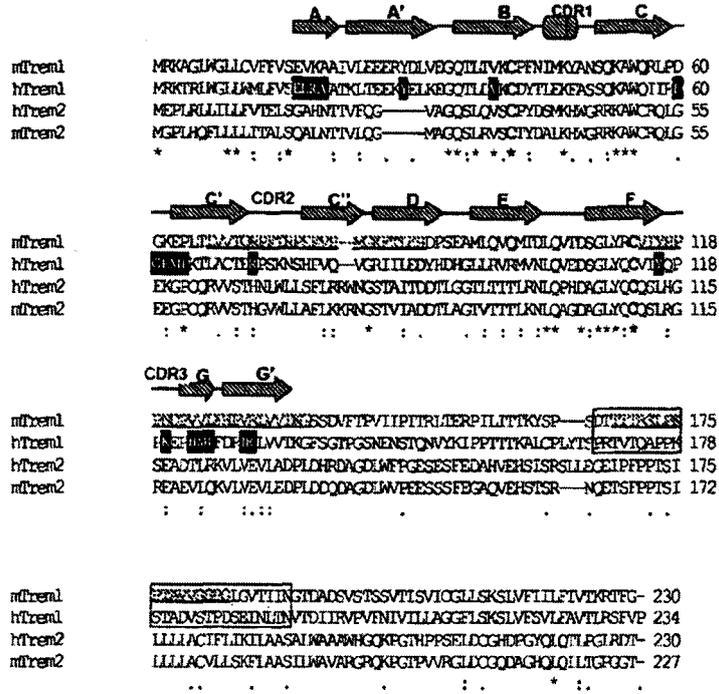


Figura 1B

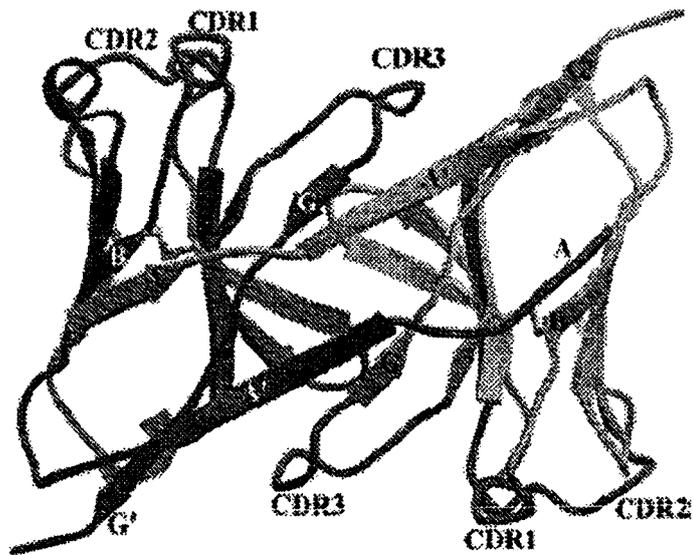


Figura 2

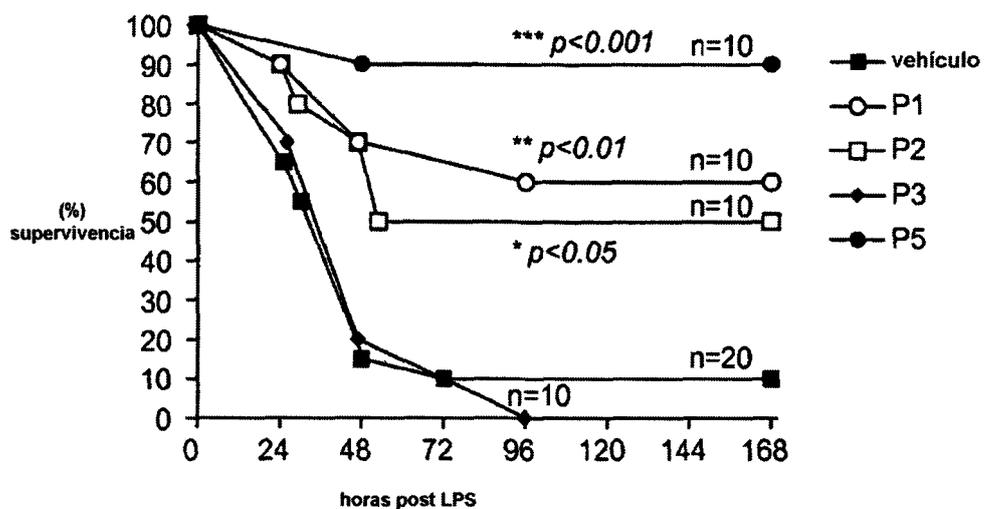


Figura 3

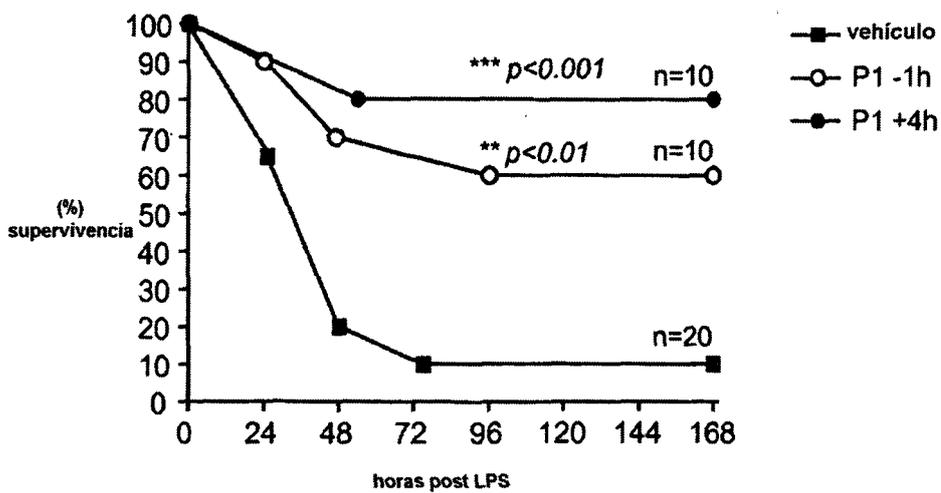


Figura 4

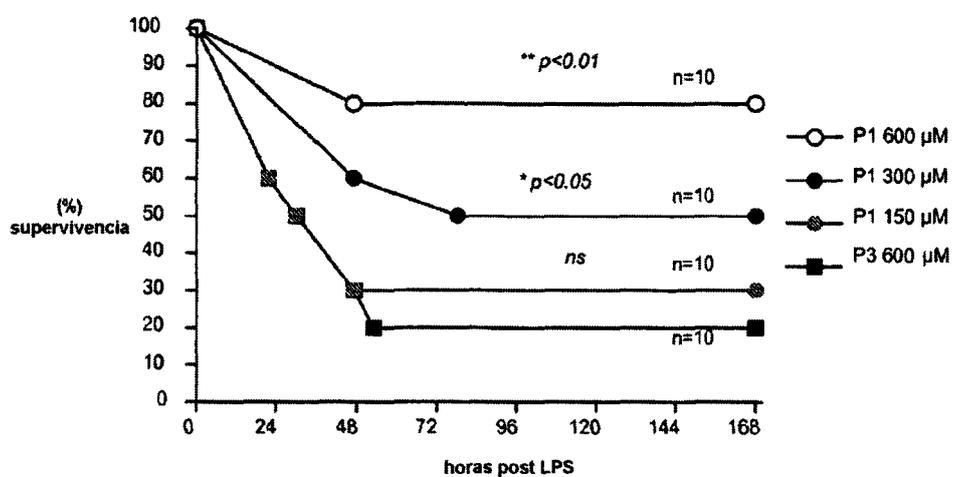


Figura 5

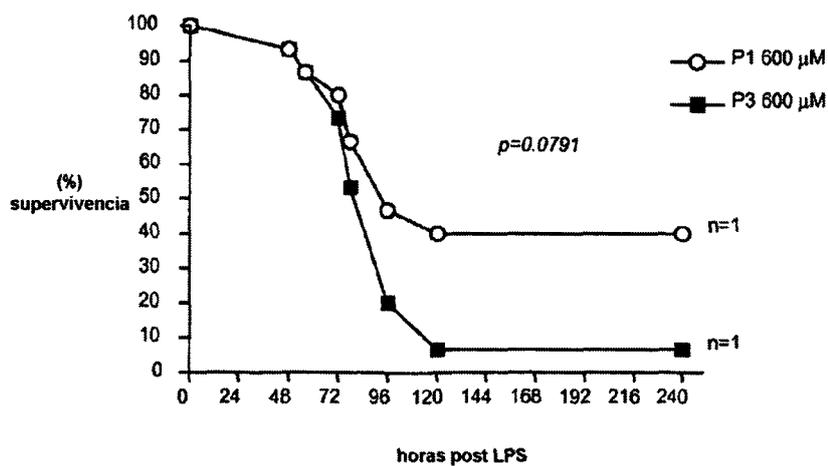


Figura 6

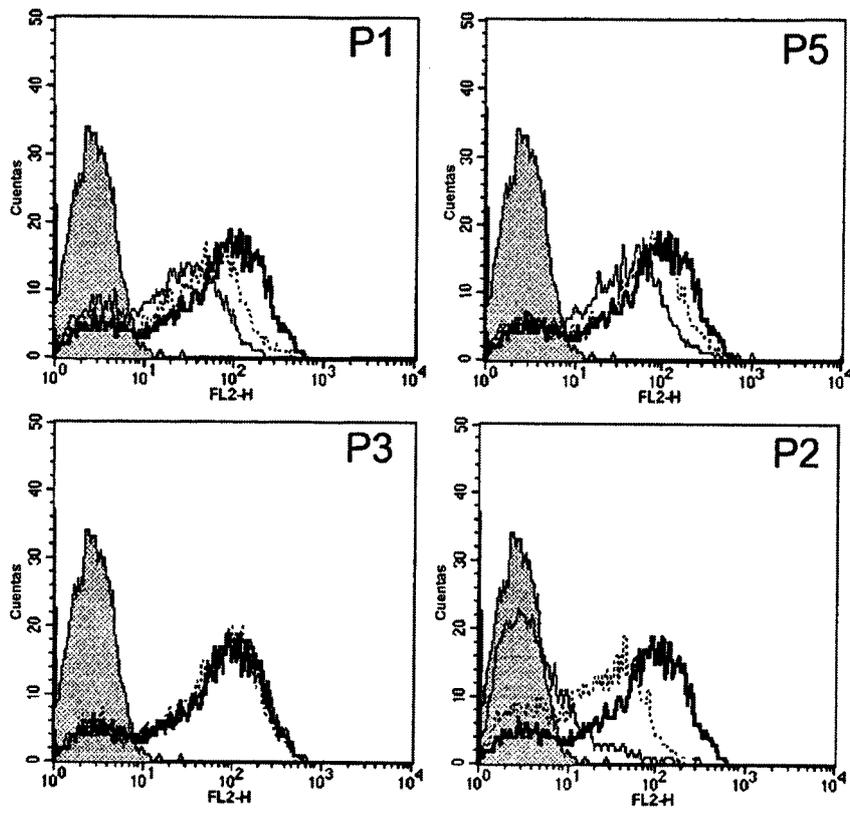
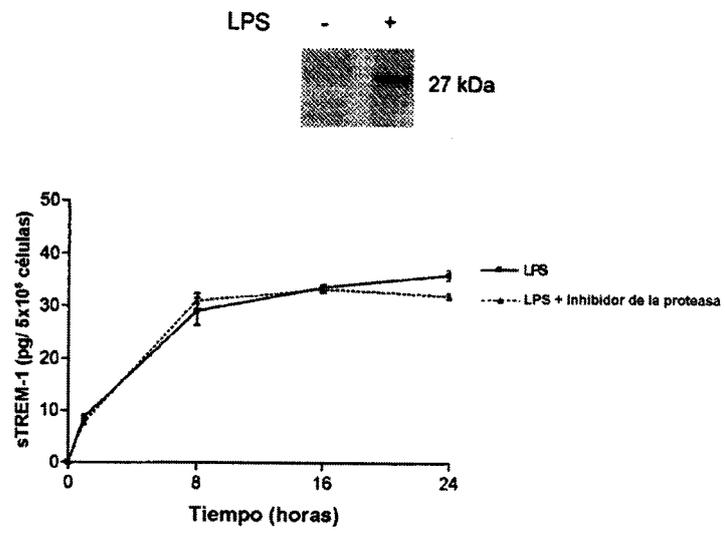


Figura 7

A



B

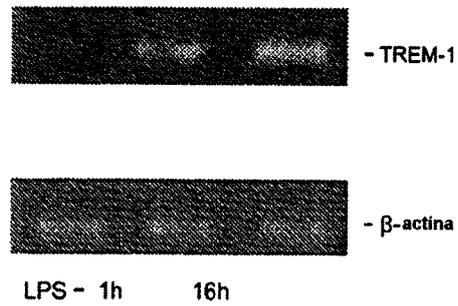


Figura 8A

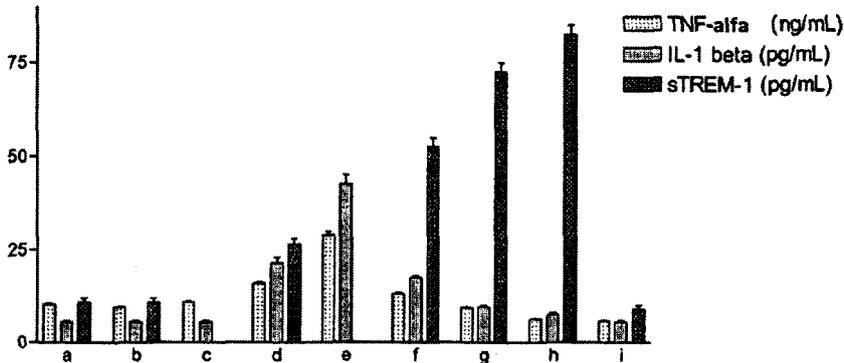


Figura 8B

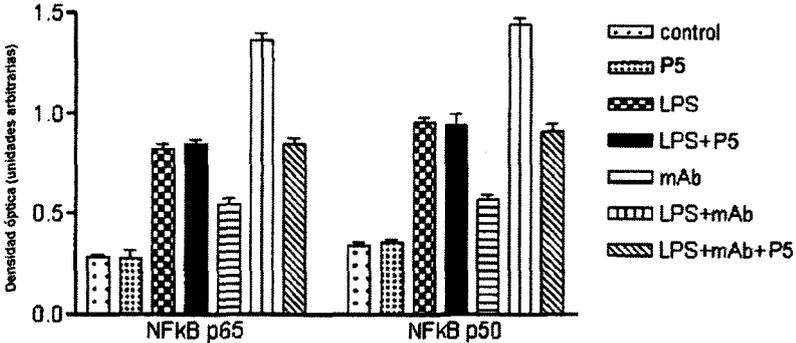


Figura 9

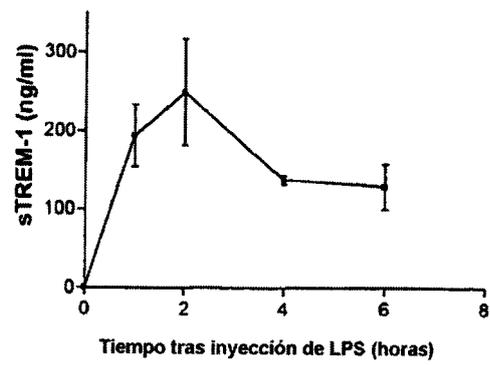


Figura 10A

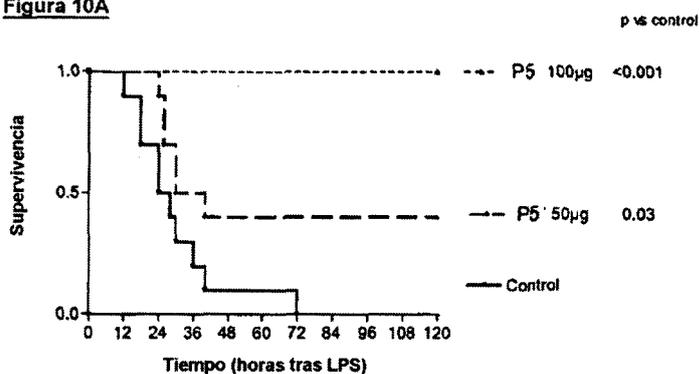


Figura 10B

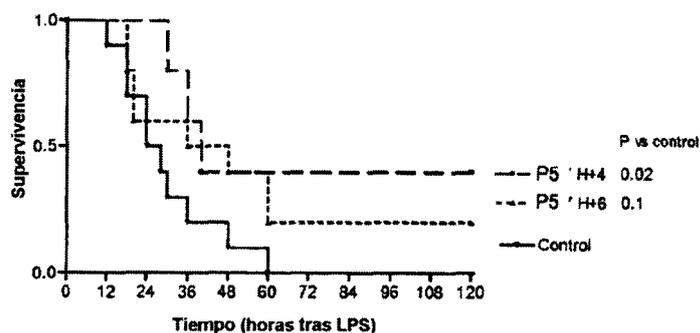


Figura 10C

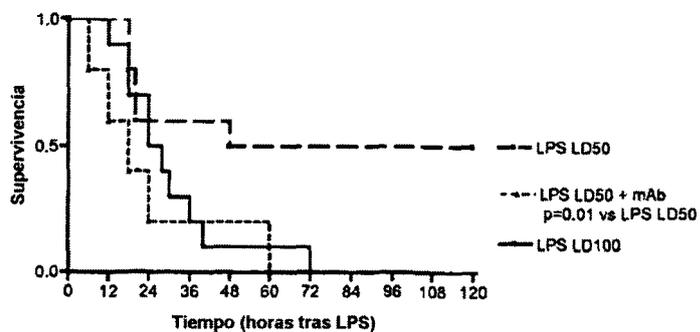


Figura 11A

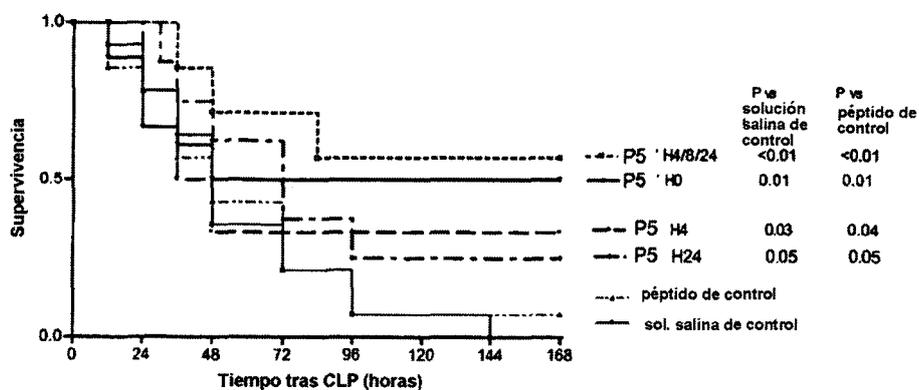


Figura 11B

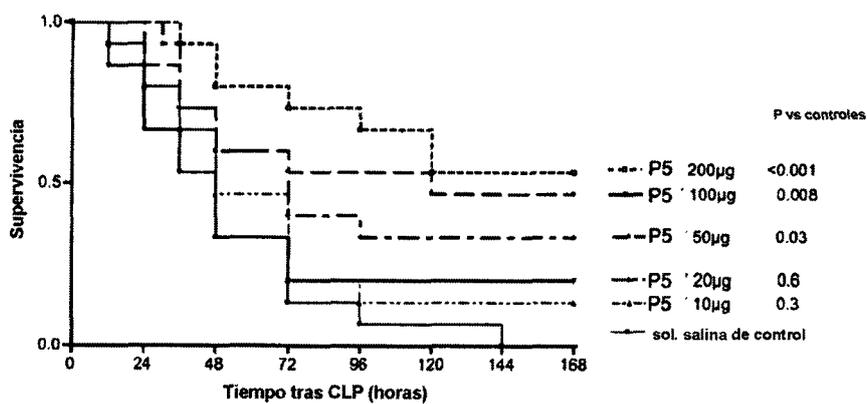


Figura 12

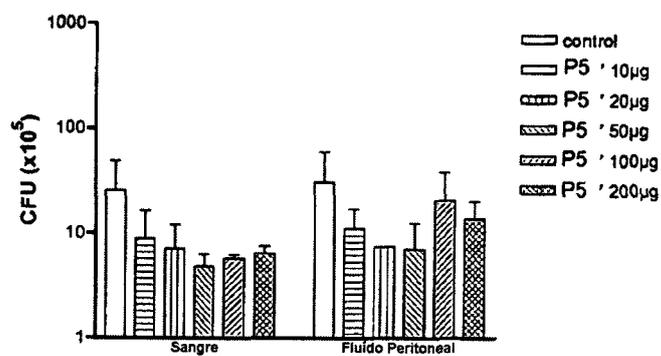


Figura 13A

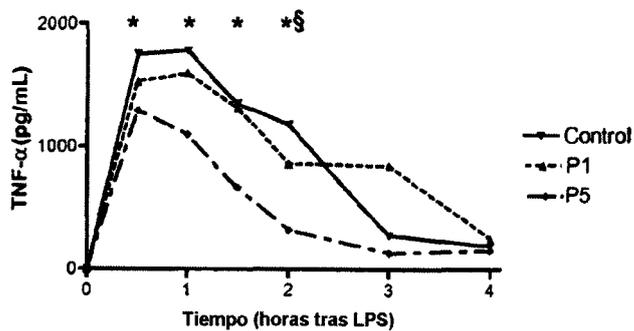


Figura 13B

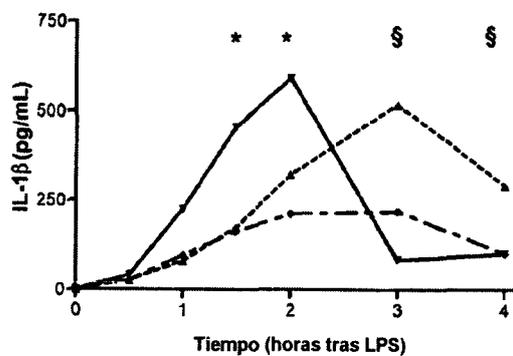


Figura 14

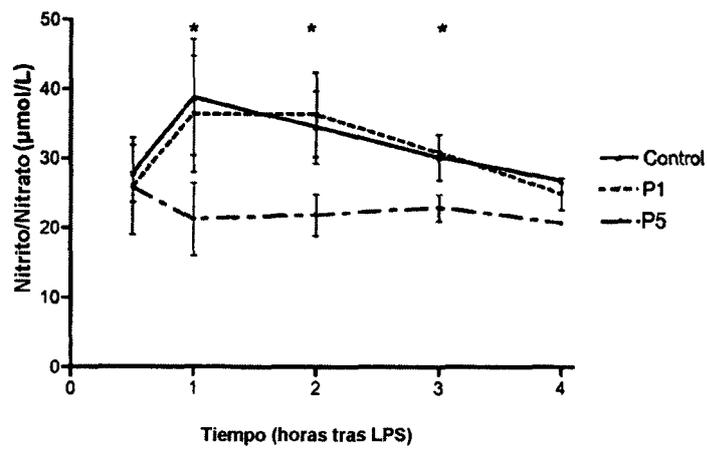


Figura 15

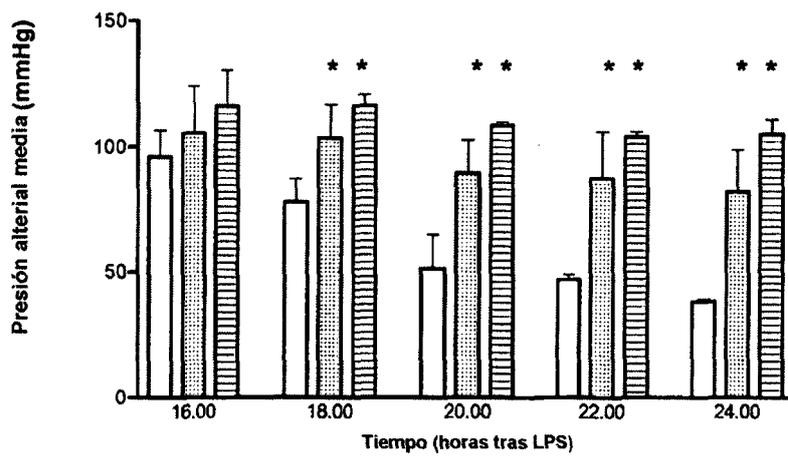


Figura 16

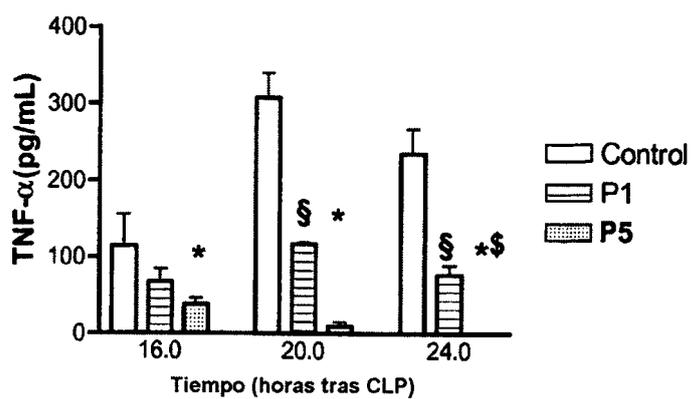
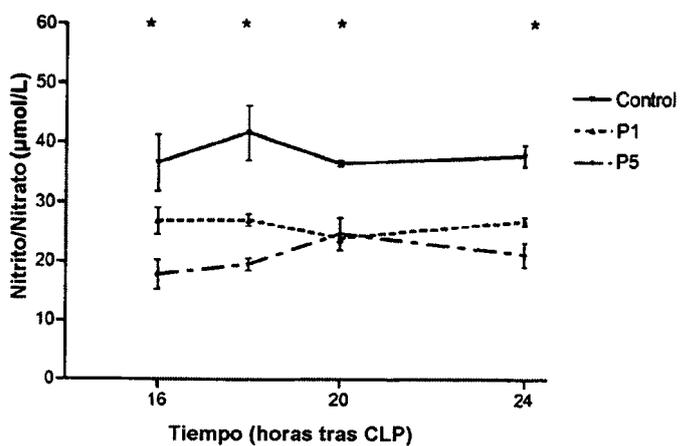


Figura 17



ES 2 360 184 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BioXell SpA
Universite Henri Poincare - Nancy 1
5 Faure, Gilbert
Gibot, Sebastien
Panina, Paola
Passini, Nadia

10 <120> Péptidos terapéuticos y método

<130> BXL-P037

<150> GB 0426146.7

<151> 2004-11-29

15 <160> 23

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20 <211> 234

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser
1 5 10 15

30

Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys
20 25 30

35

Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe

40

45

50

55

60

65

ES 2 360 184 T3

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

<210> 2

60 <211> 230

<212> PRT

<213> murina

65

ES 2 360 184 T3

<400> 2

5 Met Arg Lys Ala Gly Leu Trp Gly Leu Leu Cys Val Phe Phe Val Ser
1 5 10 15

10 Glu Val Lys Ala Ala Ile Val Leu Glu Glu Arg Tyr Asp Leu Val
20 25 30

15 Glu Gly Gln Thr Leu Thr Val Lys Cys Pro Phe Asn Ile Met Lys Tyr
35 40 45

20 Ala Asn Ser Gln Lys Ala Trp Gln Arg Leu Pro Asp Gly Lys Glu Pro
50 55 60

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

30 His Met Gly Lys Phe Thr Leu Lys His Asp Pro Ser Glu Ala Met Leu
85 90 95

35 Gln Val Gln Met Thr Asp Leu Gln Val Thr Asp Ser Gly Leu Tyr Arg
100 105 110

40 Cys Val Ile Tyr His Pro Pro Asn Asp Pro Val Val Leu Phe His Pro
115 120 125

45 Val Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Ser Ser Asp Val Phe Thr Pro Val
130 135 140

50 Ile Ile Pro Ile Thr Arg Leu Thr Glu Arg Pro Ile Leu Ile Thr Thr
145 150 155 160

55 Lys Tyr Ser Pro Ser Asp Thr Thr Thr Thr Arg Ser Leu Pro Lys Pro
165 170 175

60 Thr Ala Val Val Ser Ser Pro Gly Leu Gly Val Thr Ile Ile Asn Gly
180 185 190

65 Thr Asp Ala Asp Ser Val Ser Thr Ser Ser Val Thr Ile Ser Val Ile
195 200 205

Cys Gly Leu Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ile Ile Leu Phe Ile Val
210 215 220

Thr Lys Arg Thr Phe Gly
225 230

ES 2 360 184 T3

<210> 3
 <211> 23
 <212> PRT
 5 <213> murina

 <400> 3

 10 Leu Val Val Thr Gln Arg Pro Phe Thr Arg Pro Ser Glu Val His Met
 1 5 10 15

 15 Gly Lys Phe Thr Leu Lys His
 20

 <210> 4
 20 <211> 23
 <212> PRT
 <213> murina

 25 <400> 4

 Val Ile Tyr His Pro Pro Asn Asp Pro Val Val Leu Phe His Pro Val
 1 5 10 15

 30 Arg Leu Val Val Thr Lys Gly
 20

 35 <210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 40 <213> murina

 <400> 5

 45 Thr Thr Thr Arg Ser Leu Pro Lys Pro Thr Ala Val Val Ser Ser Pro
 1 5 10 15

 50 Gly

 <210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 55 <213> murina

 <400> 6

 60 Leu Gln Val Thr Asp Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Val Ile Tyr His Pro
 1 5 10 15

 65 Pro Asn Asp Pro Val
 20

ES 2 360 184 T3

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

5 <213> murina

<400> 7

10

Leu Gln Val Thr Asp Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Val Ile Tyr His Pro
1 5 10 15

15

Pro

<210> 8

<211> 23

20 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 8

25

Leu Thr Pro Lys His Gly Gln Arg Ser Thr His Val Thr Lys Phe Arg
1 5 10 15

30

Val Phe Glu Pro Val Met Leu
20

35 <210> 9

<211> 17

<212> PRT

40 <213> Artificial

<400> 9

45

Thr Asp Ser Arg Cys Val Ile Gly Leu Tyr His Pro Pro Leu Gln Val
1 5 10 15

50

Tyr

<210> 10

<211> 22

55 <212> ADN

<213> Artificial

<400> 10

60

ttgtctcaga actccgagct gc

22

<210> 11

65 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 360 184 T3

<400> 11
 gagacatcgg cagttgactt gg 22

5
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

<400> 12

15 ggacggagag atgccaaga cc 22

<210> 13
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<400> 13
 25 accagccagg agaatgacaa tg 22

<210> 14
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <400> 14

ggacgacatg gagaagatct gg 22

40 <210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <400> 15

atagtaatgt cacgcacgat ttcc 24

50
 <210> 16
 <211> 23
 <212> PRT
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

60 **Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val Gln Val**
1 5 10 15

65 **Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp**
20

