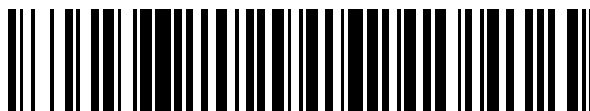


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 153**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/704** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2012 PCT/PT2012/000034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036153**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2012 E 12780554 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2753335**

54 Título: **Una antraciclina para el tratamiento de la sepsis**

30 Prioridad:

**08.09.2011 PT 11105881**

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

**05.07.2017**

73 Titular/es:

**INSTITUTO DE MEDICINA MOLECULAR (50.0%)  
Av. Prof. Egas Moniz Edificio Egas Moniz  
1649-028 Lisboa, PT y  
FERREIRA MOITA, LUIS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FERREIRA MOITA, LUIS**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

ES 2 622 153 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

Una antraciclina para el tratamiento de la sepsis

### 5 **SECTOR DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al sector de los medicamentos para el tratamiento de la sepsis, en particular, la sepsis grave, mediante la utilización de antraciclinas, a saber, epirrubicina, doxorrubicina y daunorrubicina.

### 10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La inflamación es una respuesta a los estímulos nocivos que limita el daño de los tejidos y tiene como objetivo restablecer la homeostasis<sup>4</sup>. El huésped percibe patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) en los microorganismos y patrones moleculares asociados al daño (DAMP) procedentes de las células moribundas a través de receptores de reconocimiento de patrón codificados por la línea germinal (PRR) que reconocen estructuras de firma conservadas en no auto y en auto<sup>5-7</sup>. Estos sensores están presentes tanto en células inmunitarias profesionales (que incluyen neutrófilos, macrófagos y células dendríticas) como en no profesionales y su activación inicia cascadas de señalización intracelular que conducen a la expresión transcripcional de mediadores inflamatorios, tales como citoquinas y quimioquinas. Es necesario que la inflamación se termine de forma eficaz después de la eliminación del activador original y la reparación del tejido dañado. En el huésped susceptible, la sobreproducción de mediadores inflamatorios o una respuesta exagerada a su presencia puede llevar a shock séptico, a la destrucción del tejido, a pérdida permanente de función, a inmunodeficiencia o a autoinmunidad<sup>8</sup>.

La sepsis es una afección mortal que surge como una respuesta inflamatoria sistémica a una infección<sup>9</sup>. Se inicia por una superproducción de mediadores proinflamatorios que conducen potencialmente a una función cardíaca reducida, a una permeabilidad vascular aumentada y al desequilibrio metabólico que finalmente causa el fallo multiorgánico y la muerte<sup>10</sup>. La sepsis incluye un continuo de condiciones que oscilan entre el síndrome inflamatorio sistémico (SIRS), que puede progresar a fallo multiorgánico y finalmente a shock séptico y a la muerte<sup>11</sup>. La sepsis es la principal causa de muerte en unidades de cuidados intensivos y la tercera causa de mortalidad hospitalaria<sup>12,13</sup>. La incidencia de sepsis y su carga económica ha aumentado en las últimas décadas un 1% cada año<sup>13,14</sup> y, a pesar de una mejora significativa en el diagnóstico y las medidas de soporte, las tasas de mortalidad aún oscilan, como mínimo, entre menos del 10% en SIRS hasta casi el 80% en el shock séptico. La fisiopatología de la sepsis sigue sin entenderse bien. Como resultado, los elementos básicos del tratamiento (antibióticos, control de la fuente de infección y soporte de órganos) no han cambiado significativamente en los últimos cincuenta años, y las tentativas de traducir los resultados básicos de la investigación en nuevas intervenciones eficaces han tenido un éxito limitado o ningún éxito<sup>11</sup>.

La sepsis es un síndrome heterogéneo y dinámico causado por disfunción inmunitaria que puede asumir diferentes aspectos de forma temporal y en componentes diferentes del sistema inmunitario. Por ejemplo, la etapa temprana de la sepsis se caracteriza por un ambiente hiperinflamatorio debido a la activación abrumadora de las respuestas inmunitarias innatas por infección o daño de tejido, mientras que los momentos posteriores se pueden describir mejor como un estado inmunosupresor<sup>10</sup>. El paso temprano de iniciación es dependiente de factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) y la fase progresiva retardada y lenta, dependiente de mediadores tardíos, tales como el grupo de alta movilidad de caja-1 (HMGB1)<sup>13</sup>.

De la forma más común, la sepsis se desencadena por una infección bacteriana que causa una producción excesiva de mediadores preinflamatorios, que incluyen las TNF e IL-1 $\beta$  iniciales críticas, lo que conduce a la activación de cascadas de señalización en espiral, que causan, en último lugar, el fallo multiorgánico y la muerte<sup>10</sup>. Los inventores de la presente invención realizaron cribados químicos y genéticos, que los condujeron a la identificación del grupo de antraciclinas como inhibidores potentes de su secreción y a la identificación de ATM como regulador negativo de la inflamación. Las antraciclinas confieren una fuerte protección al modelo en ratón de sepsis incrementando la tolerancia a la carga de la infección, sin aumentar la muerte de las bacterias. A nivel molecular, inhiben el programa de inflamación inducido por bacterias, de una manera parcialmente dependiente de ATM. Específicamente, se requiere ATM para la protección *in vivo* contra la sepsis, lo que se basa en la inhibición de mediadores inflamatorios, la inducción de autofagia y la protección del daño en órganos diana.

### 55 **DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS**

La figura 1 representa un cribado primario para identificar los compuestos en la biblioteca de la colección de espectros que inhiben la secreción de TNF e IL-1 $\beta$ . (A) es un diagrama de dos dimensiones de los resultados Z de producción de TNF e IL-1 $\beta$ , calculados después del desafío de células THP-1 con *E. coli* fijada en PFA durante 24 horas en presencia de 10  $\mu$ M de cada compuesto. El cuadrado define el área en la que los compuestos se consideran éxitos primarios, es decir, inhibición tanto de TNF como de IL-1 $\beta$ , (B) representa la producción de IL-1 $\beta$  y TNF por células THP-1 expuestas a *E. coli* (4 horas) después de una preincubación (1 hora) con concentraciones crecientes de epirrubicina. Los resultados que se muestran representan la media  $\pm$  desviación estándar en muestras por triplicado en uno de tres ensayos independientes. (C) es una identificación transcripcional de la respuesta de la

- línea celular THP-1 a la epirrubicina y la agrupación no supervisada de perfiles de expresión de micromatrices. Los datos de expresión normalizada de micromatrices a partir de dos muestras replicadas de células THP-1 sin tratar (Control\_1 y Control\_2) y células The-1 expuestas a *E. Coli* fijada en PFA (*E.coli*\_1 y *E.coli*\_2), epirrubicina (Epi\_1 y Epi\_2) o ambas (*E.coli*+Epi\_1 y *E.coli*+Epi\_2) se utilizaron para llevar a cabo un análisis de agrupación después de filtrar los genes con baja expresión o bien con baja variación entre las muestras. El gradiente de color indica la variación en los niveles de expresión dentro de un intervalo de log<sub>2</sub> de -2 a 2, después de centrar la media de los valores de expresión de genes. La clasificación GO de genes en agrupaciones seleccionadas (Agrupación Ecoli1 a 3 y Agrupación Epi1 a 4) se indica a la derecha. Las líneas verticales marcan la localización de las agrupaciones en el árbol de genes. (D) se refiere a la validación por RT-qPCR de datos de micromatrices. Los gráficos indican la expresión relativa de IL-1 $\beta$ , TNF, CCL2, CXCL10, STAT1, STAT2, STAT4 y STAT5a, tal como se calcula por qRT-PCR en células THP-1 expuestas a *E. coli* (4 horas) después de la preincubación (1 hora) con epirrubicina 5  $\mu$ M. Los resultados que se muestran representan el número medio de moléculas de ARNm de cada gen por molécula de ARNm de GAPDH  $\pm$  desviación estándar a partir de muestras por triplicado.
- La figura 2 muestra que la epirrubicina protege contra CLP grave. (A) y (B) se refieren a la supervivencia de los animales de tipo salvaje C57BL/6 sometidos a (A) CLP o (B) inyección de LPS letal con vehículo (PBS) o epirrubicina (0,6  $\mu$ g/g de peso corporal) en el momento del procedimiento y 2 $\leq$  horas más tarde. NS, no significativo; \*\*P<0,01; \*\*\*\*P<0,0001 (prueba de orden logarítmico (Mantel-Cox) para 2A, 2B y prueba de Mann-Whitney para 2C). (C) muestra la carga polimicrobiana (UFC) en la sangre de animales C57BL/6 sometidos a CLP en puntos temporales indicados. Tratamiento con PBS y epirrubicina, tal como anteriormente. Cada círculo representa animales individuales. Las barras son valores de la media  $\pm$  SEM. La epirrubicina contrarresta la inflamación y el daño del tejido asociado con CLP. Cuando se indica (+) animales C57HL/6 recibieron PBS (n=3) o epirrubicina (0,6  $\mu$ g/g de peso corporal) (n = 3) a las 0 y 24 horas después de la CLP. (D) representa concentraciones plasmáticas de TNF, (E) de IL-1 $\beta$ , (F) de IL-6 y (G) de HMGB1, 24 horas después de la CLP. Los resultados que se muestran representan valores de la media  $\pm$  SEM a partir de lecturas por triplicado por animal. Se presentan las mediciones de (H) LDH, (I) CK, (J) ALT y (K) urea en plasma de animales C57BL/6 que experimentan CLP y tratados con la misma dosis y programación, tal como anteriormente. Los resultados que se muestran representan valores de la media  $\pm$  SEM a partir de lecturas por duplicado por animal (n=5).
- La figura 3 muestra que los efectos antiinflamatorios de la epirrubicina están mediadas por ATM (A) es un diagrama de puntuaciones Z, ordenadas en orden ascendente, de la producción de IL-1 $\beta$  por las células THP-1 después del silenciamiento de genes diana ("knockdown") utilizando un grupo seleccionado de construcciones de la biblioteca de vectores lentivirales ARNsh TRC seguido por la estimulación de *E. coli* fijada con PFA durante 24 horas. Cada punto representa una construcción individual. El círculo rojo define el área en la que los compuestos se consideran aciertos primarios. (B) se refiere a un análisis por citometría de flujo de la forma activada del ATM, fosforilada en la serina 1981, en células THP-1 dejadas sin tratamiento o tratadas con epirrubicina sola (1  $\mu$ M) (5 horas), expuestas a *E. coli* fijada con PFA (4 horas) o *E. coli* (4 horas) más el tratamiento previo con epirrubicina (1 hora). (C) representa la producción de IL-1 $\beta$  y TNF por células THP-1 expuestas a *E. coli* (4 horas) después de una preincubación (1 hora) con PBS, epirrubicina (1  $\mu$ M) o epirrubicina más KU-55933 (2  $\mu$ M) cuando se indica (+). Los resultados que se muestran representan la media  $\pm$  desviación estándar a partir de muestras por triplicado en uno de 3 ensayos independientes. (D) se refiere a la expresión de IL-1 $\beta$ , TNF, CCL2 y CXCL10, tal como se calculan por qRT-PCR en células THP-1 tratadas tal como en (C). Los resultados que se muestran representan el número medio de moléculas de ARNm de cada gen por molécula de ARNm de GAPDH  $\pm$  desviación estándar a partir de muestras por triplicado.
- La figura 4 muestra que la protección dependiente de ATM de la epirrubicina contra la CLP se basa en la inducción de autofagia. (A) representa la supervivencia de animales C57BL/6 de tipo salvaje y *Atm*<sup>-/-</sup> sometidos a CLP y tratados con PBS o epirrubicina (0,6  $\mu$ g/g de peso corporal) en el momento del procedimiento y 24 horas más tarde. (B) representa la supervivencia de animales C57BL/6 de tipo salvaje tratados con PBS, etopósida y epirrubicina sometidos a CLP. La dosis de etopósida fue de 2,0  $\mu$ g/g de peso corporal. La dosis de epirrubicina y la programación de tratamiento, tal como en (A). (C) es un análisis por citometría de flujo de la inducción de autofagia en: (i) células THP-1 sin tratamiento o con pretratamiento con epirrubicina (1  $\mu$ M) (1 hora) y expuestas a *E. coli* fijada con PFA (4 horas) (histograma superior) o (ii) células THP-1 pretratadas con KU-55933 (2  $\mu$ M) o epirrubicina (1  $\mu$ M) más KU-55933 (2  $\mu$ M) (1 hora) y expuestas a *E. Coli* fijada con PFA (4 horas) (histograma inferior). (D) representa una supervivencia de animales C57BL/6 de tipo salvaje y *LC3b*<sup>-/-</sup> sometidos a CLP y tratados con PBS o epirrubicina en la dosis y la programación tal como en (A). \*P<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*P<0,001 (prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox)). La epirrubicina confiere protección contra CLP grave de manera terapéutica. (E) se refiere a la supervivencia de animales C57BL/6 de tipo salvaje sometidos a CLP tratados con epirrubicina (0-6  $\mu$ g/g de peso corporal) en el tiempo indicado en ausencia de meropenem (panel izquierdo superior); con una administración de meropenem (40  $\mu$ g/g de peso corporal/día) empezando en el momento del procedimiento (panel superior derecho) o con el tratamiento con meropenem (40  $\mu$ g/g de peso corporal/día) empezando 12 horas después de la CLP (panel inferior izquierdo).
- La figura 5 muestra que las antraciclinas inhiben la secreción de TNF e IL-1 $\beta$ . La producción de TNF por células The-1 expuestas a *E. coli* (4 horas) después de una preincubación (1 hora) con concentraciones crecientes de daunorrubicina, doxorubicina y epirrubicina. Los resultados que se muestran representan la media  $\pm$  desviación estándar de muestras por triplicado en uno de 3 ensayos independientes.

La figura 6 muestra que otra antraciclina, además de la epirrubicina, protege contra la CLP grave. Supervivencia de animales C57BL/6 de tipo salvaje sometidos a CLP tratados con vehículo (PBS), epirrubicina (0,6 µg/g de peso corporal), doxorubicina (0,5 µg/g de peso corporal) o daunorrubicina (0,6 µg/g de peso corporal) en el momento del procedimiento y 24 horas más tarde.

La figura 7 muestra que la epirrubicina no contrarresta la migración de células inflamatorias al sitio de la inflamación. Cuantificación de (A) células totales (B) neutrófilos, (C) macrófagos, (D) células B, linfocitos (E) CD4 T y (F) CD8 T en la cavidad peritoneal 18 horas después de la CLP de animales C57EL/6 de tipo salvaje tratados con PBS o epirrubicina (0,6 µg/g de peso corporal) en el momento del procedimiento.

La figura 8 representa la producción de radicales libres en las células THP-1, tal como se determina por citometría de flujo con CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Las células se dejaron sin tratamiento o, cuando se indica (+), se pretrataron con epirrubicina (1 mM) (1 hora) o epirrubicina (1 mM) más KU-55933 (2 mM) (1 hora) y se expusieron a *E. coli* fijada con PFA (4 horas). Los resultados que se muestran representan la intensidad de la media normalizada de control de valores de fluorescencia ± error estándar de la media de tres experimentos independientes.

La figura 9 se refiere a la supervivencia de animales C57BL/6 de tipo salvaje y Nrf2<sup>-/-</sup> sometidos a CLP y tratados con PBS o epirrubicina (0,6 µg/g de peso corporal) a las 0 y 24 horas después de la CLP.

La figura 10 se refiere a la supervivencia de animales C57BL/6 de tipo salvaje y miR-145a<sup>-/-</sup> sometidos a CLP y tratados con PBS o epirrubicina (0,6 µg/g de peso corporal) a las 0 y 24 horas después de la CLP.

La figura 11 presenta la evolución temporal de la inducción de miR-146a en respuesta al tratamiento con epirrubicina de células THP-1 expuestas a *E. coli* fijada con PFA, tal como se mide por RT-qPCR.

## **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN**

La sepsis sigue siendo una afección inflamatoria sistémica mal entendida con altas tasas de mortalidad y limitadas opciones terapéuticas además de las medidas de soporte de órganos<sup>1</sup>. De la forma más frecuente, la sepsis se desencadena por una infección bacteriana que causa una producción excesiva de mediadores proinflamatorios, incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF) crítico inicial e interleuquina 1β (IL-1β), que conduce a la activación de cascadas de señalización en espiral, que en última instancia causan fallo multiorgánico y la muerte<sup>2,3</sup>. En el presente documento los inventores de la presente invención utilizan un cribado de fármacos para identificar el grupo aprobado clínicamente de las antraciclinas como potentes inhibidores *in vitro* de dos iniciadores claves de la sepsis, TNF e IL-1β. *In vivo*, las antraciclinas confieren una protección fuerte contra la sepsis grave inducida por ligadura y punción cecal (CLP) en ratones. Este efecto protector se basa en la inducción de autofagia y en un programa antiinflamatorio que aumenta la tolerancia a la infección sin reducir la carga bacteriana. Utilizando un cribado basado en ARNsh, los inventores de la presente invención identificaron el ataxia telangiectasia mutado (ATM) como mediador del efecto protector de las antraciclinas. Los ratones deficientes en ATM (Atm<sup>-/-</sup>) son refractarios a este efecto protector sucumbiendo a sepsis grave con cinética similar a los ratones de tipo salvaje no tratados. Los resultados de los inventores de la presente invención identifican el grupo de las antraciclinas como opciones terapéuticas eficaces en sepsis y ATM como una diana molecular potencial en condiciones impulsadas por la inflamación.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

A efectos de identificar moléculas pequeñas que inhiben simultáneamente la secreción de TNF e IL-1β, los inventores de la presente invención llevaron a cabo un cribado químico utilizando 2.320 compuestos. Los inventores de la presente invención identificaron 45 candidatos principales (figura 1A y tabla I) que inhiben ambas citoquinas.

Tabla I

Lista de fármacos candidatos con efecto simultáneo sobre la secreción de TNF e IL-1β ordenados según la puntuación de TNF			
ID	Compuesto	puntuación Z de TNFa	puntuación Z de IL1b
1505708	Clorhidrato de epirrubicina	-4,474857631	-1,212875226
300037	Acetato de Crasin	-4,448741528	-2,126298968
1501193	Erysolin	-4,442389411	-1,162701697
1504079	Tomatina	-4,440219344	-2,626087357
330001	Dactinomicina	-4,13760156	-1,187827575
1505483	Doxorrubicina	-4,071115136	-2,412138965
200007	Ácido gambógico	-3,862359373	-1,529656531

Continuación

Lista de fármacos candidatos con efecto simultáneo sobre la secreción de TNF e IL-IL-1 $\beta$ ordenados según la puntuación de TNF			
ID	Compuesto	puntuación Z de TNFa	puntuación Z de IL1b
200090	Obtusaquinona	-3,829374842	-1,532189516
200022	Clorhidrato de Aklavine	-3,511681732	-1,408917561
1504181	Pristimerina	-3,474946679	-0,952562058
1505955	Sulfato de colistina	-3,457325884	-0,918619053
1504082	Dihidrocelastrol	-3,387513735	-1,102010407
1505908	Mangostin trimetil éter	-3,162805301	-1,634164354
1504218	Acrisorcina	-3,10607388	-0,959612692
300549	Ácido acetil isogambógico	-3,056795183	-1,48116787
201522	Amida de ácido gambógico	-3,013926221	-1,517154207
<b>1500223</b>	<b>Daunorrubicina</b>	<b>-3,007093086</b>	<b>-0,995459172</b>
201604	Pirromicina	-2,980583694	-1,456377283
1500260	Piritiona de zinc	-2,951809549	-1,872292546
201664	Celastrol	-2,941287145	-1,499560887
1500319	Gramicidina	-2,91855912	-1,84556962
1503006	Isotiocianato de bencilo	-2,908582737	-1,034306584
1503904	Patulina	-2,874616362	-0,902703858
1503640	Partenolida	-2,842267433	-0,921962794
100005	Antotocol	-2,834385142	-1,868706598
ID	Compuesto	puntuación Z de TNFa	puntuación Z de IL1b
100009	Celedrona	-2,817231786	-1,852572153
1504098	Fenotrina	-2,810792588	-0,983918754
1505438	Valerato de hidrocortisona	-2,794271243	-2,722889618
1504240	1,4-naftoquinona	-2,77797604	-1,349015947
1505450	Hemisuccinato de prednisolona	-2,72427413	-2,095888301
1500315	Violeta Genciana	-2,696385799	-1,835724332
310010	Helenina	-2,683894042	-0,943744357
310035	Sulfato de sanguinarina	-2,651620816	-1,160017114
1SO2074	Clorhidrato de Alexidin	-2,648173863	-0,94122L729
1503278	Clorhidrato de mitoxantrona	-2,562729474	-1,158920135
1505723	Acetato de betametasona	-2,560814606	-0,950513609
100146	7-desacetoxi-6,7-deshidrogedunina	-2,517707805	-1,789647817
1503432	Mepartricina	-2,504992413	-1,081865327
201524	Ácido dihidrogambógico	-2,488781431	-1,48996453
1505722	Desoximetasona	-2,417754689	-0,995122645
1505726	Desonida	-2,297715909	-0,945977097
1500521	Pamoato de pirvinio	-2,268148981	-1,683811286



## Continuación

Lista de fármacos candidatos con efecto simultáneo sobre la secreción de TNF e IL-1 $\beta$ ordenados según la puntuación de TNF			
ID	Compuesto	puntuación Z de TNFa	puntuación Z de IL1b
1505168	Lactato de etacridina	-2,218841761	-1,389229184
1501149	Clorhidrato de ritodrina	-2,149761571	-1,268303571
1505125	Dipropionato de alclometazona	-1,999200408	-0,922964076

Este efecto inhibitor se disoció de la citotoxicidad de los compuestos probados sobre células THP-1. Entre ellos los inventores de la presente invención descubrieron 3 representantes de la familia de antraciclinas de agentes quimioterapéuticos (epirrubicina, doxorrubicina y daunorrubicina). Para validar el efecto de los candidatos principales en la inhibición de la secreción de IL-1 $\beta$  y de TNF, los inventores de la presente invención trataron células THP-1 con concentraciones crecientes de epirrubicina y descubrieron que la concentración inhibitora media (IC50) era 0,40  $\mu$ M para IL-1 $\beta$  y 0,50  $\mu$ M para TNF, (figura 1B). Además, los inventores de la presente invención han probado los efectos de miembros adicionales de los grupos de fármacos de antraciclina (daunorrubicina y doxorrubicina) identificados en el cribado químico principal y han descubierto resultados similares a los obtenidos para la epirrubicina (figura 5). Los inventores de la presente invención han concluido que el grupo de las antraciclinas, no la epirrubicina sola, inhibe la secreción de TNF e IL-1 $\beta$ , sugiriendo que no es un efecto específico de la epirrubicina sino una propiedad general del grupo de las antraciclinas posiblemente relacionada con sus propiedades de daño del ADN.

Para estudiar los efectos del tratamiento con epirrubicina sobre células THP-1 y THP-1 estimuladas con *E. coli*, los inventores de la presente invención realizaron un análisis de agrupamiento no supervisado de perfiles de expresión de ARNm del genoma completo. Los inventores de la presente invención encontraron una firma común de expresión del gen de epirrubicina cuando se compararon muestras tratadas con fármacos y no tratadas, que incluye tanto la regulación positiva como la regulación negativa de un subconjunto de genes (figura 1C, agrupación Epi1 y figura 1C, agrupaciones Epi2-4, respectivamente). La clasificación de ontología de genes (GO) revela el enriquecimiento para genes implicados en la respuesta al daño de ADN, control del ciclo celular y apoptosis. Los cambios en la expresión génica observados en los principales grupos de genes regulados positivamente (figura 1C, agrupaciones Ecoli1 y Ecoli3) o regulados negativamente (figura 1C, agrupación Ecoli2) por *E. coli* se eliminan en las células tratadas con epirrubicina. Estas agrupaciones de genes se enriquecen significativamente en categorías GO y las vías relacionadas con las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Para validar los efectos de la epirrubicina en micromatrices, los inventores de la presente invención utilizaron RT-qPCR para medir la expresión relativa de los genes identificados en las principales agrupaciones inducida por bacterias (figura 1D).

Los inventores de la presente invención escogieron el modelo de ligadura y punción cecal (CLP) de ratón para investigar los efectos *in vivo* de la epirrubicina. En la CLP, la sepsis es un resultado de origen abdominal infeccioso polimicrobiano, que conduce a bacteriemia y una respuesta inflamatoria sistémica<sup>15</sup>. Los inventores de la presente invención han ajustado su gravedad a una sepsis de grado alto, en la que, como mínimo, el 80% de ratones C57BL/6 mueren en el plazo de las 48 horas después del procedimiento inicial. En estas condiciones, la epirrubicina administrada i.p. en una solución salina (PBS) en el momento de la CLP y otra vez 24 horas más tarde, en un total de 1,2  $\mu$ g/g de peso corporal de ratón aumentó de forma reproducible y significativa la supervivencia de ratones C57BL/6 sometidos a CLP en casi el 80%, sin la utilización de antibiótico alguno (figura 2A). La inyección intravenosa de epirrubicina produjo resultados similares (datos no mostrados). El efecto *in vivo* protector no se limita a la epirrubicina, dado que los inventores de la presente invención también han observado una protección comparable cuando se utiliza doxorrubicina y daunorrubicina en condiciones similares (figura 6). En cuanto a los resultados *in vitro*, esto sugiere que también *in vivo*, las antraciclinas, no la epirrubicina sola, son protectoras en la sepsis. Una semana después de la administración de epirrubicina, los ratones no están inmunocomprometidos ya que ellos aclaran una infección intranasal secundaria con el virus muHV-4, de manera similar a los ratones de control (Chora y Marques, y otros, no publicada). Los inventores de la presente invención determinaron que la protección no era debido a un efecto antibiótico de la epirrubicina, dado que el fármaco también protegió completamente ratones C57BL/6 de la muerte en el modelo de LPS de shock séptico letal (figura 2B) y ratones tratados con epirrubicina y no tratados mostraron cifras similares de bacterias circulantes en la sangre después del procedimiento CLP (figura 2C). Por lo tanto, la epirrubicina confiere tolerancia del huésped a la infección sin aumentar la muerte de bacterias. Los descubrimientos de los inventores de la presente invención son contradictorios, dado que se ha demostrado que las antraciclinas inducen inflamación aguda cuando se inyectan en el abdomen<sup>16,17</sup>. Sin embargo, las concentraciones de fármaco utilizadas en estos estudios fueron, como mínimo, 10 veces más elevadas que las utilizadas en el presente documento. Mediante la utilización de concentraciones inferiores, los inventores de la presente invención pueden reducir la citotoxicidad de estos fármacos (y la resultante liberación de DAMP proinflamatorios por las células moribundas) y posiblemente revelan efectos farmacológicos adicionales mediados por las células diana.

55

A continuación, los inventores de la presente invención investigaron la respuesta inflamatoria sistémica inducida por la CLP. Veinticuatro horas después del procedimiento CLP, los inventores de la presente invención observaron una secreción robusta de mediadores inflamatorios, tales como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 y HMGB1 que se redujo drásticamente en ratones tratados con epirrubicina (figura 2D-G). Para validar los mecanismos de protección inducidos por antraciclinas, los inventores de la presente invención midieron marcadores serológicos de daño de órganos en los ratones CLP en el suero de ratones no tratados y los compararon con los de ratones tratados con epirrubicina 24 horas después del procedimiento inicial de CLP. La concentración sérica de LDH (daño celular pulmonar y general), CK (músculo), ALT (hígado) y urea (riñón) se redujo a niveles casi basales en ratones tratados con epirrubicina con respecto a ratones no tratados (figura 2H-K, respectivamente), sugiriendo que las antraciclinas tienen fuertes efectos protectores en función del órgano.

Para identificar mecanismos de protección de la epirrubicina en la CLP, los inventores de la presente invención realizaron un cribado *in vitro* basado en ARN de horquilla corta (ARNsh), centrándose en quinasas y fosfatasa. Los inventores de la presente invención descubrieron algunos reguladores negativos de IL-1 $\beta$ , como respuesta a la exposición a *E. coli*, incluyendo los genes ataxia telangiectasia mutado (ATM) y Checkpoint Quinasa1 (cheek1) (figura 3A y datos no mostrados), ambos mediadores críticos de una respuesta al daño del ADN (DDR). El ATM es un regulador maestro de la vía DDR<sup>10</sup> y se sabía que se activaba por antraciclinas y otros agentes de daño del ADN<sup>19</sup>. Mediante la utilización de un anticuerpo fosfoespecífico contra la forma activada del ATM, los inventores de la presente invención descubrieron que la epirrubicina, sola o en combinación con la estimulación con *E. coli* desencadenó la activación de ATM (figura 3B). La estimulación con *E. coli* sola fue un activador de ATM pobre, pero reproducible (figura 3B). Los inventores de la presente invención confirmaron estos resultados mediante inmunotransferencia (datos no mostrados). *In vitro*, la epirrubicina fue capaz de disminuir la secreción, tanto de IL-1 $\beta$  como de TNF, pero sólo la regulación negativa de IL-1 $\beta$  era dependiente de la activación de ATM, que se podría rescatar utilizando el inhibidor específico de ATM KU-55933 (figura 3C). La regulación negativa mediada por la epirrubicina de los niveles de expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ , CCL2 y CXCL10 (figura 3D y datos no mostrados) era independiente de ATM en el caso de TNF (figura 3D).

Para comprobar la contribución del ATM al efecto protector de la epirrubicina contra la sepsis grave, los inventores de la presente invención compararon la supervivencia de ratones de tipo salvaje (*Atm*<sup>+/+</sup>) frente a deficientes en ATM (*Atm*<sup>-/-</sup>) sometidos a CLP y tratados con epirrubicina. Los inventores de la presente invención descubrieron que la expresión de ATM es absolutamente necesaria para mediar el efecto protector de la epirrubicina, (figura 4A), pero posiblemente no es suficiente. En línea con esta interpretación, el etoposide, conocido por causar menos daño del ADN complejo, solo rescata parcialmente la mortalidad inducida por el CLP a pesar de la activación de las vías dependientes de ATM<sup>20</sup> (figura 4B).

A continuación, los inventores de la presente invención exploraron posibles mecanismos para explicar el papel protector de la epirrubicina en la sepsis. Los inventores de la presente invención descubrieron que, *in vitro*, la epirrubicina es capaz de contrarrestar el aumento de ROS generado por la exposición a *E. coli* de células THP-1 de forma dependiente de ATM (figura 8). Sin embargo, los ratones que son deficientes en el factor nuclear (derivados del eritroide 2)-luke 2 (NRF2), un regulador maestro de la depuración de ROS, están todavía protegidos por la epirrubicina contra la mortalidad debido a la CLP (figura 9). Por lo tanto, la epirrubicina induce una respuesta a la depuración de ROS dependiente de ATM que es ampliamente prescindible por su efecto protector en la sepsis.

La apoptosis aumentada de los neutrófilos puede atenuar la patogenia de la sepsis<sup>21</sup>. Esto sería una hipótesis simple y atractiva teniendo en cuenta que las antraciclinas inician una DDR que conduce a apoptosis aumentada si la lesión del ADN es demasiado grave para ser reparada<sup>21</sup>. Sin embargo, los datos de los inventores de la presente invención muestran que los ratones tratados con epirrubicina tienen un número mayor, no menor, de neutrófilos viables en el abdomen, excluyendo un papel importante para este mecanismo (figura 7B).

La biogénesis de algunos ARNm, incluyendo miR-146a (un regulador negativo de la inflamación<sup>22</sup> y un biomarcador propuesto en la sepsis<sup>23</sup>), es dependiente de ATM<sup>24</sup>. Por lo tanto, los inventores de la presente invención compararon la supervivencia de los ratones de tipo salvaje con la de ratones deficientes en miR-146a en presencia o ausencia de epirrubicina. Los inventores de la presente invención concluyen que la protección otorgada por este fármaco es dependiente de la presencia de miR-146a (figura 10). Sin embargo, el análisis de los inventores de la presente invención por RT-qPCR de la expresión de miR-146a en cualquiera de las dos células RAW (datos no mostrados) o células THP-1 (figura 11) no apoyan un papel de la epirrubicina en la inducción de este microARN. Por lo tanto, dirigir la inducción de miR-146a no es el mecanismo por el cual la epirrubicina protege contra el modelo de LPS de shock séptico o CLP.

A continuación, los inventores de la presente invención exploraron el requisito de inducción de autofagia en la protección inducida por la epirrubicina. Los inventores de la presente invención predijeron que la activación de ATM inducida por epirrubicina podría aumentar y sostener la autofagia debido a que se conoce que el daño del ADN induce autofagia<sup>25</sup>, posiblemente de una manera dependiente de ATM<sup>36</sup>, y el ATM es un regulador negativo de mTOR, que es, en sí mismo, un inhibidor de la autofagia<sup>27,29</sup>. Mediante la utilización del análisis FACS, los inventores de la presente invención descubrieron que la epirrubicina induce la autofagia en las células THP-1 y que

este efecto es dependiente de ATM (figura 4C). El pretratamiento con el inhibidor de ATM KU 55933 elimina este efecto (figura 4). A continuación, los inventores de la presente invención compararon la supervivencia de ratones de tipo salvaje con ratones defectuosos en autofagia (deficientes en LC3b) en presencia o ausencia de la epirrubicina. Los datos muestran que la vía de la autofagia es necesaria para el efecto *in vivo* de epirrubicina en la protección contra la sepsis (figura 4D). Los inventores de la presente invención concluyeron que el efecto protector de la epirrubicina en la sepsis es, como mínimo en parte, debido a la inducción de autofagia dependiente de ATM.

Finalmente, se estudió la ventana terapéutica de la epirrubicina en ratones. Cuando se administra sola, la epirrubicina confiere protección fuerte en el momento del procedimiento o hasta 3 horas después de la iniciación de CLP. Cuando se administra sólo 6 horas después de la CLP, la epirrubicina pierde rápidamente su efecto protector. Sin embargo, si se administra en combinación con el meropenem, aunque este antibiótico es sólo administrado 12 horas después de la CLP, la epirrubicina en dosis baja confiere protección completa hasta, como mínimo, 24 horas después del procedimiento inicial (figura 4E). Los resultados de los inventores de la presente invención sugieren que la epirrubicina y, más generalmente, el grupo de antraciclinas, son muy eficaces en la prevención de la mortalidad por sepsis, en condiciones que reflejan el estándar humano de cuidados. La ventana terapéutica de 24 horas suele ser suficiente para que este fármaco útil en la clínica para la mayoría de los pacientes que están en el hospital o bien buscan atención médica en las primeras horas del inicio de los síntomas.

### **Objetivo de la invención**

De esta manera, el objetivo de la presente invención es una antraciclina para su utilización en el tratamiento de la sepsis, estando la antraciclina seleccionada entre epirrubicina, doxorubicina y daunorubicina, en particular epirrubicina.

Aunque las antraciclinas son convenientes para el tratamiento de cualquier tipo de sepsis, son particularmente eficaces en el tratamiento de la sepsis grave.

### **Parte experimental**

#### **Procedimientos**

##### ***Cribado químico in vitro***

Se colocaron en placas de 96 pocillos, monocitos humanos THP-1 (ATCC TIB-202 de la colección americana de cultivos de tejidos) a razón de 10 células/ml y se incubaron con cada uno de los 2.320 compuestos que se incluyen en la colección de espectros (Microsource Discovery Systems, Gaylordsville, CT) a 10  $\mu$ M durante 1 hora. A continuación, las células se provocaron con el 4% de *E. coli* DH5 $\alpha$  fijado con PFA a una multiplicidad de infección (MOI) de 20 células bacterianas por célula THP-1 durante 24 horas adicionales. Se recogieron los sobrenadantes de células y las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF se cuantificaron mediante DAS-ELISA, utilizando DuoSet<sup>®</sup> IL-1 $\beta$ /IL-1F2 humana y DuoSet<sup>®</sup> TNF (R&D Systems<sup>®</sup>), respectivamente, según el protocolo de la empresa.

##### ***Determinación del perfil del transcriptoma***

Se normalizaron datos sin procesar de micromatrices ("raw microarray data") utilizando el paquete *aroma.affimetrix*<sup>29</sup> implementado en R. Se llevó a cabo un análisis de agrupamiento ("clustering") llevado a cabo con Multiple ExperimentViewer MeV4\_7\_3<sup>30</sup> en un subconjunto de 3.513 genes seleccionado del conjunto completo de datos para una expresión de log<sub>2</sub> absoluto, como mínimo, de 7 en dos (de ocho) matrices. Para reducir aún más el número de genes a agrupar, se aplicó un filtro de varianza para seleccionar el 50% de los genes con SD más elevada. Después de centrar la media de los datos mediante media de genes/hilera, se llevó a cabo un análisis de agrupamiento utilizando mediciones de distancia euclidiana. Se llevó a cabo el análisis de la ontología de los genes y enriquecimiento de la vía en agrupamientos seleccionados de genes utilizando el programa GO-Elite ([http://www.genmapp.org/go\\_elite/go\\_elite.html](http://www.genmapp.org/go_elite/go_elite.html))<sup>31</sup>.

##### ***La biblioteca de ARNi del consorcio de ARNi***

La descripción detallada de la biblioteca de ARNi lentiviral del consorcio de ARNi (TRC), utilizada en este estudio se describió originalmente en <sup>32</sup> (véase [www.broad.mit.edu/rnai/trc/lib](http://www.broad.mit.edu/rnai/trc/lib) para detalles adicionales).

##### ***Cribado basado en ARNsh***

Los inventores de la presente invención generaron un subgrupo de trabajo de la biblioteca de vectores lentivirales de ARNsh del consorcio de ARNi (TRC)<sup>33,35</sup> que permite el silenciamiento de la mayoría de los genes que son quinasas o bien fosfatasa humanas. Este subconjunto estaba compuesto de 1.440 vectores dispuestos individualmente de ARNsh lentivirales dirigidos a ~700 genes, después de seleccionar los ARNsh (dos de promedio) basándose en los datos de eficacia de silenciamiento disponibles del Broad Institute of MIT and Harvard. Se colocaron células THP-1 en placas de 96 pocillos a razón de 10<sup>6</sup> células/ml y se infectaron con lentivirus que expresaban ARNsh. Las células



infectadas se seleccionaron 48 horas más tarde con puromicina. Después de 3 días de selección, las placas se duplicaron. Una de las placas se utilizó para medir el número de células mediante el ensayo de viabilidad celular de azul de Alamar® (Invitrogeia®), según las instrucciones del fabricante. En la otra placa, las células se estimularon con el 4% de *E. coli* DH5α fijada en PFA a una multiplicidad de infección (MOI) de 20 células bacterianas por células THP-1. Veinticuatro horas después de la estimulación, se recogieron los sobrenadantes de células y las citoquinas IL-1β y TNF se cuantificaron mediante DAS-ELISA. Todos los valores de datos de ensayos de secreción de IL-1β y TNF se normalizaron dividiendo la cantidad de IL-1β y TNF en el medio acondicionado 24, 12, 8, 6, 4 ó 2 horas después de la estimulación con *E. coli* entre el número de células en cada pocillo y, a continuación, entre la concentración promedio por célula de la placa. Los resultados se transformaron de forma logarítmica natural. Las puntuaciones se ordenaron en orden ascendente y se representaron en un gráfico. Los inventores de la presente invención calcularon 1,5 SVDV por encima y por debajo de la media para identificar los genes que cambiaron la secreción de IL-1β y TNF cuando se silenciaron. Se utilizó la misma estrategia para identificar los compuestos que cambiaron la secreción de IL-1β y TNF. Los genes seleccionados se sometieron a dos o más rondas de validación fenotípica.

#### RT-qPCR

Se extrajo el ARN total con TRIzol (Invitrogen) y se transcribió de forma inversa con transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). La reacción de PCR cuantitativa se realizó con Power SYBRgreen (Applied Biosystems) en un termociclador a tiempo real Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science /QIAGEN). Las secuencias de los cebadores se recuperaron del banco de cebadores (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) o se diseñaron utilizando Primer-BAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>). Los valores se formalizaron a GAPDH.

#### Valoración de la autofagia y el contenido de ROS

Se estimularon células THP-1, tal como se ha descrito anteriormente. Se valoró la autofagia mediante la incubación de células con el reactivo de detección verde Cyto-ID® (Enzo Life sciences), según las instrucciones del fabricante. Se valoró la generación de radicales libres celulares mediante la incubación de células durante 20 minutos con 0,5 mM de la sonda de radicales libres ancha diacetato de 5-(y 6)-clorometil-2'7'-diclorodihidrofluoresceína acetyl éster (CM-H2DCFDA; Molecular Probes). Se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo y se analizaron los datos utilizando el software FlowJo.

#### Ratones

El cuidado de los animales y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con las normas y directrices de Estados Unidos y Portugal, después de la aprobación por los respectivos comités locales (Instituto de Medicina Molecular e Instituto Gulbenkian de Ciência). Todos los ratones utilizados tenían de 8 a 12 semanas de vida. Los ratones se criaron y mantuvieron en condiciones de ausencia de patógenos (SPF). Se obtuvieron C57BL/6 y C57BL/6 *ATM*<sup>-/-</sup> del Instituto Gulbenkian de Ciência (un obsequio gentileza del Dr. Vasco Barreto). Se proporcionaron ratones C57BL/6 *Nrf2*<sup>-/-</sup> originariamente del RIKEN BioResource Center (Koyadai, Tsukuba, Ibaraki, Japón)<sup>31</sup> y posteriormente en el Instituto Gulbenkian de Ciência. La ligadura y punción cecal se realizó tal como se ha descrito anteriormente<sup>15</sup>.

#### Ensayo de unidades formadoras de colonias

Se obtuvo líquido peritoneal mediante lavado peritoneal con 5 ml de PBS estéril (Sigma) y se recogió sangre mediante punción cardíaca. Inmediatamente se colocaron en placas diluciones sucesivas de sangre y lavado peritoneal sobre placas de agar tripticasa de soya II suplementadas con el 5% de sangre de oveja. Se contaron las unidades formadoras de colonias después de 12 horas de incubación a 37°C.

#### Tinciones y citometría de flujo

Se obtuvieron leucocitos de infiltración peritoneal obtenidos por lavado con 5 ml de PBS estéril helado (Sigma), se lavaron y se bloquearon con Ab de ratón de receptor Ab anti-FcγIII/II de ratón (clon 93) diluido en PBS que contenía el 2% de FCS (v/v) durante 20 minutos a 4°C. Se detectaron los marcadores de superficie mediante la incubación durante 30 minutos a 4°C con Ab anti-CD4 (clon GK1.5), anti-CD8 (clon 53-6.7), anti-CD19 (clon 6D5), anti-Ly-6G (clon 1A8) de ratón (todos de Biolegend) y anticuerpo monoclonal anti-neutrófilos (clon 7/4) (Abcam). Las células muertas se excluyeron mediante cotinción con yoduro de propidio. Se determinó el número total de células mediante citometría de flujo utilizando un número fijo de perlas de látex (Beckman Coulter) adquiridas conjuntamente con un volumen preestablecido de la suspensión celular. Para la tinción intracelular de fosfo-ATM, se lavaron las células T14P-1 estimuladas y se fijaron con metanol helado. Se incubó Ab anti-fosfo-ATM pS1981, clon 10H11.E12 (IgG1k) de ratón (Rockland) durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido por una incubación de Ab secundario conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes). Se midió la fluorescencia por citometría de flujo y se analizaron los datos analizados utilizando el software FlowJo.

*Inmunotransferencia*

Se utilizaron anticuerpos fosfo-ATM (4526, Cell Signaling, Danvers, MA, dilución 1:1.000) de ratón, y ATM total (2873, Cell Signaling, Danvers, MA, dilución 1:1.000) de conejo durante la noche a 4°C. Se detectaron anticuerpos primarios utilizando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (1h; RT) y se revelaron con el kit de detección de quimioluminiscencia SuperSignal (Pierce, Carcavelos, Portugal).

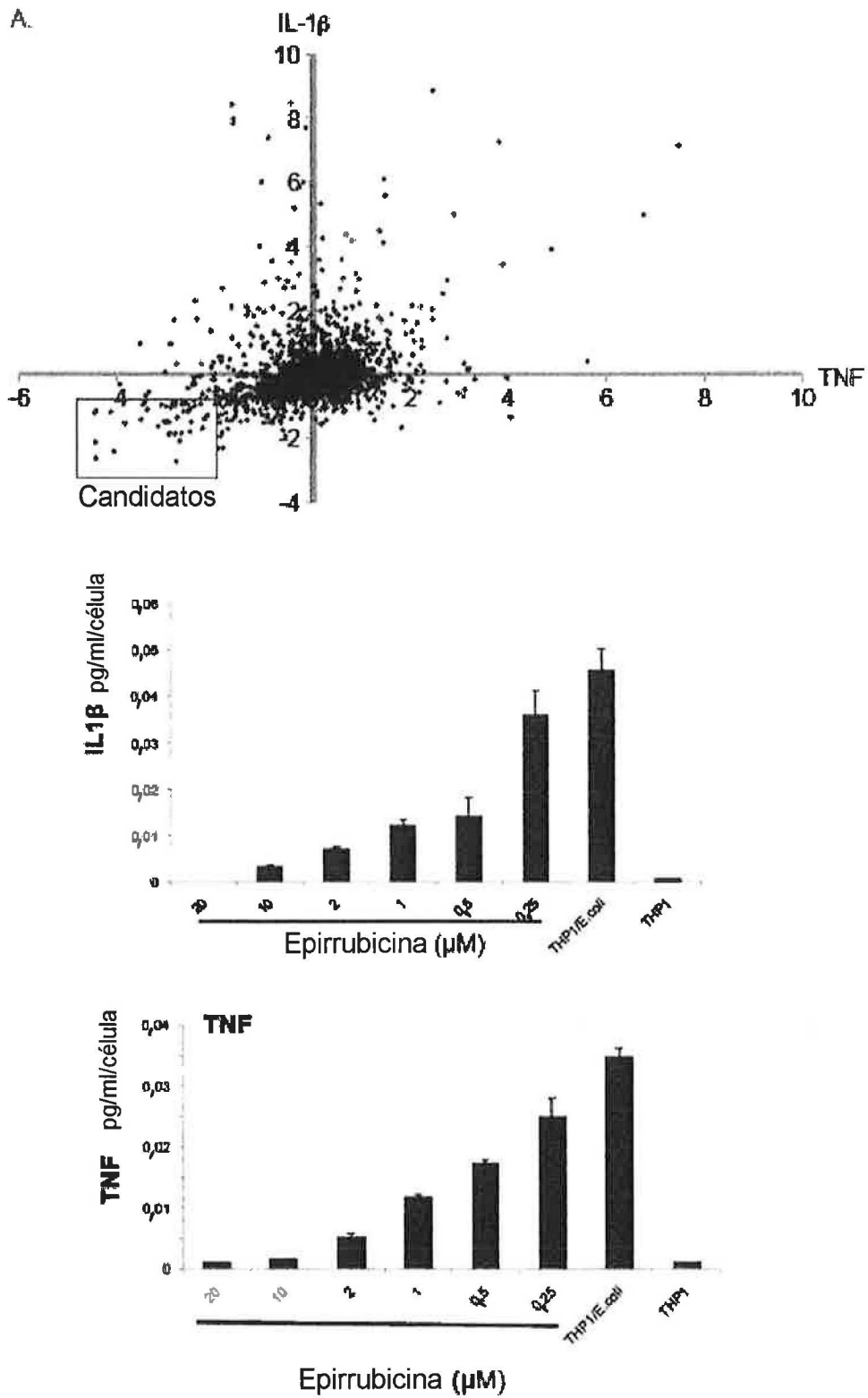
**Referencias**

1. Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891 (2002).
2. Doi, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S. & Star, R.A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest* 119, 2868-2878 (2009).
3. Cavassani, K.A., y otros. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 205, 2.609-2.621 (2008).
4. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435 (2008).
5. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298 (1997).
6. Janeway, C.A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216 (2002).
7. Sims, G.P., Rowe, D.C., Rietdijk, S.T., Herbst, R. & Coyle, A.J. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28, 367-388 (2010).
8. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805-820 (2010).
9. Bone, R.C., Sibbald, W.J. & Sprung, C.L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 101, 1481-1483 (1992).
10. Rittirsch, D., Flierl, M.A. & Ward, P.A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8, 776-787 (2008).
11. Suffredini, A.F. & Munford, R.S. Novel therapies for septic shock over the past 4 decades. *JAMA* 306, 194-199 (2011).
12. Angus, D.C. & Wax, R.S. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 29, S109-116 (2001).
13. Ulloa, L. & Tracey, K.J. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med* 11, 56-63 (2005).
14. Martin, G.S., Mannino, D.M., Baton, S. & Moss, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348, 1546-1554 (2003).
15. Rittirsch, D., Huber-Lang, M.S., Flierl, M.A. & Ward, P.A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 4, 31-36 (2009).
16. Krysko, D.V., y otros. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. *Cell Death Differ* 18, 1316-1325 (2011).
17. Sauter, K.A., Wood, L.J., Wong, J., Iordanov, M. & Magun, B.E. Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1beta through activation of the NLRP3 inflammasome. *Cancer Biol Ther* 11, 1008-1016 (2011).
18. Ciccia, A. & Elledge, S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40, 179-204 (2010).
19. Siu, W.Y., y otros. Topoisomerase poisons differentially activate DNA damage checkpoints through ataxia-telangiectasia mutated-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Ther* 3, 621-632 (2004).
20. Montecucco, A. & Biamonti, G. Cellular response to etoposide treatment. *Cancer Lett* 252, 9-18 (2007).
21. Garrison, S.P., y otros. The p53-target gene puma drives neutrophil-mediated protection against lethal bacterial sepsis. *PLoS Pathog* 6, e1001240 (2011).
22. Taganov, K.D., Boldin, M.P. & Baltimore, D. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26, 133-137 (2007).
23. Wang, J.F., y otros. Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 184-188 (2010).
24. Zhang, X., Wan, G., Berger, F.G., He, X. & Lu, X. The ATM kinase induces microRNA biogenesis in the DNA damage response. *Mol Cell* 41, 371-383 (2011).
25. Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Garcia, A., Panayiotidis, M.I. & Franco, R. DNA damage and autophagy. *Mutat Res* 711, 158-166 (2011).
26. Chen, L.H., y otros. Autophagy inhibition enhances apoptosis triggered by BO-1051, an N-mustard derivative, and involves the ATM signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 81, 594-605 (2010).
27. Alexander, A., y otros. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4153-4158 (2010).
28. Alexander, A., Kim, J. & Walker, C.L. ATM engages the TSC2/mTORC1 signaling node to regulate autophagy. *Autophagy* 6 (2010).
29. Bengtsson, H., Irizarry, R., Carvalho, B. & Speed, T.P. Estimation and assessment of raw copy numbers at the single locus level. *Bioinformatics* 24, 759-767 (2008).
30. Saeed, A.I., y otros. TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 411, 134-193 (2006).
31. Salomonis, N., y otros. Alternative splicing in the differentiation of human embryonic stem cells into cardiac precursors. *PLoS Comput Biol* 5, e1000553 (2009).
32. Moffat, J., y otros. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell* 124, 1283-1298 (2006).

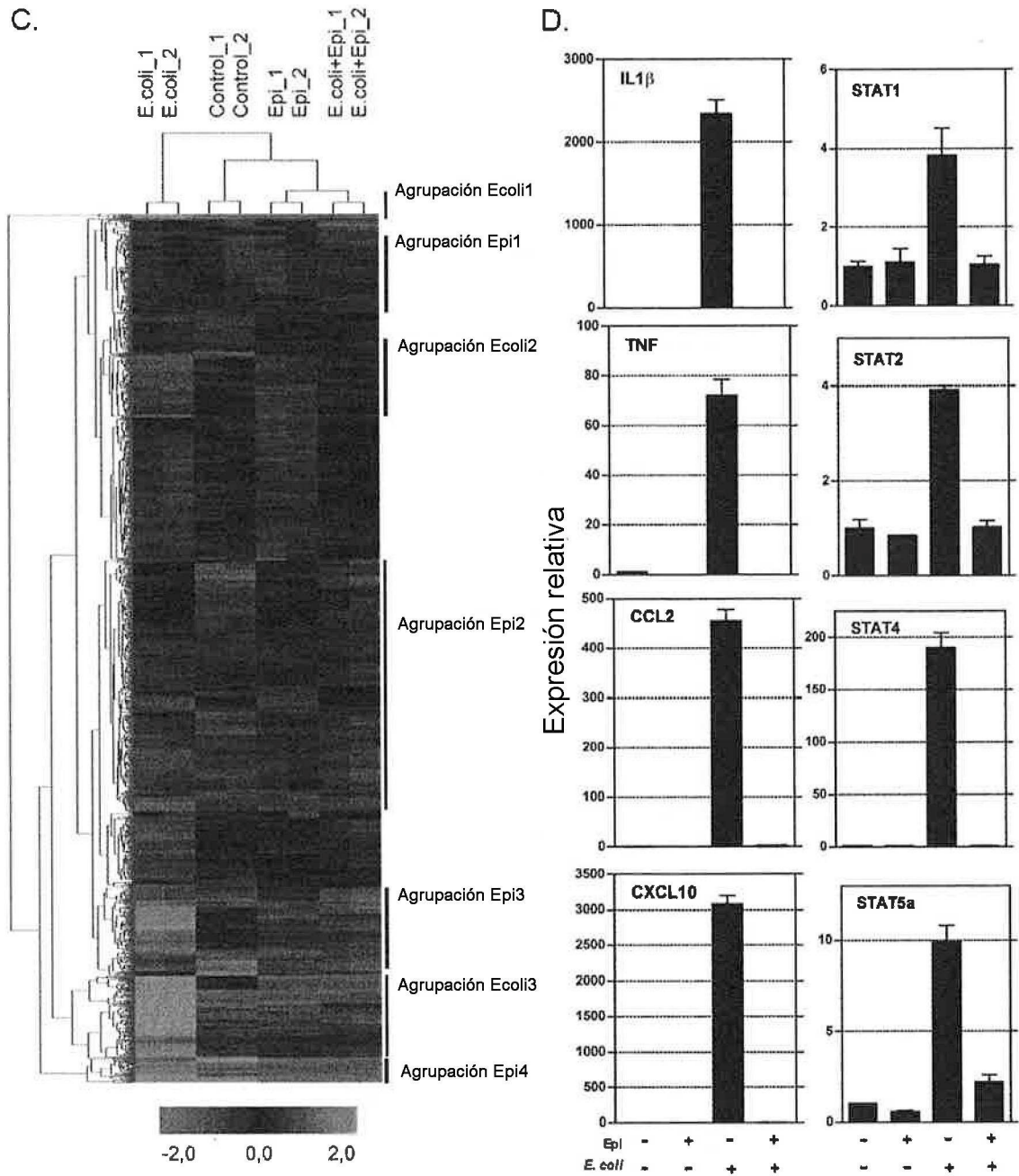
33. Root, D.E., Hacohen, N., Hahn, W.C., Lander, E.S. & Sabatini, D.M. Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nat Methods* 3, 715-719 (2006).
34. Itoh, K., y otros. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 313-322 (1997).
- 5 35. Shannon Reagan-Shaw, y otros. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal. Life Sciences Forum* 22, 659-661 (2007).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Antraciclina para la utilización en el tratamiento de la sepsis, en la que la antraciclina se selecciona entre epirrubicina, doxorubicina y daunorrubicina y se administra una vez, tan pronto como sea posible, después del diagnóstico y de nuevo 24 horas más tarde, en la misma dosificación, en una dosis total de 1,2  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal para epirrubicina y daunorrubicina o en una dosis total de 1,0  $\mu\text{g/g}$  de peso corporal para doxorubicina.
2. Antraciclina, para la utilización, según la reivindicación 1, que es epirrubicina.
- 10 3. Antraciclina, para la utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el tratamiento de sepsis grave.

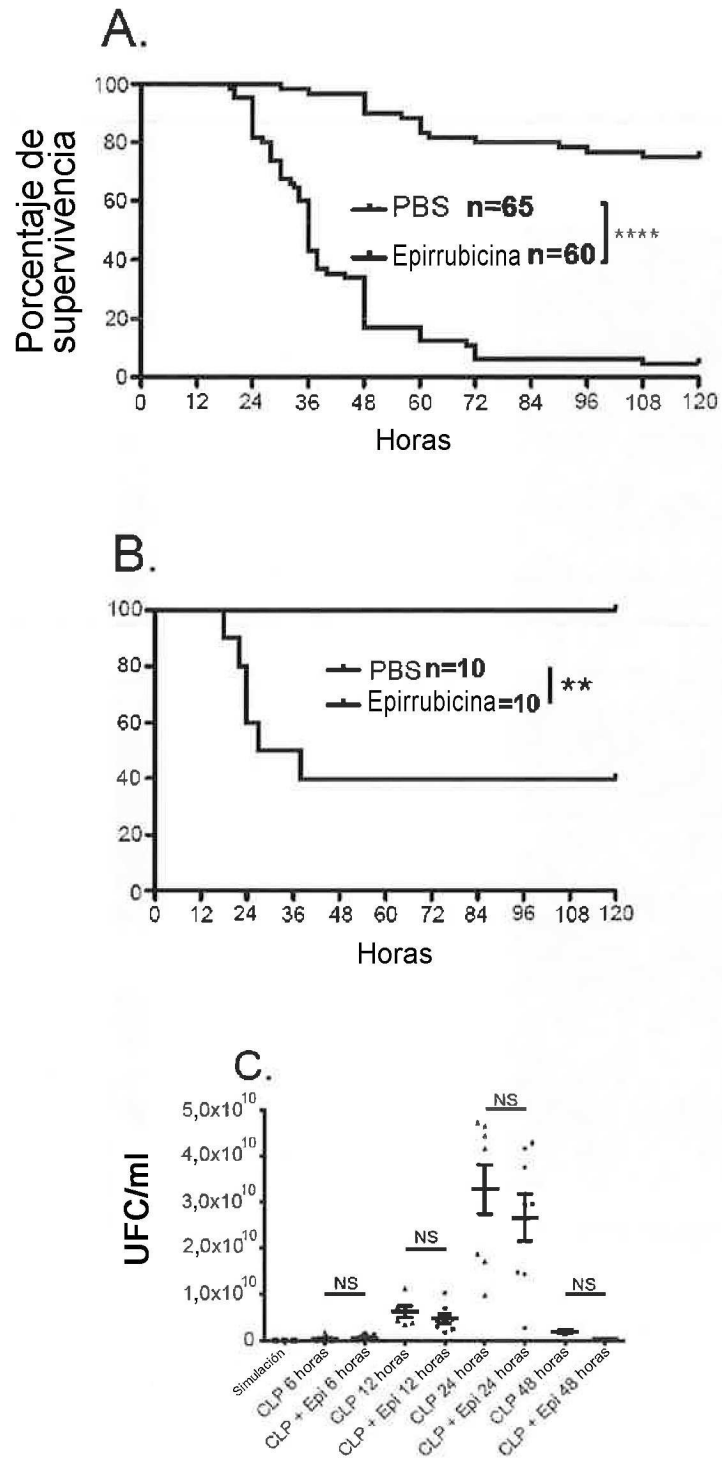


**Fig. 1**



**Fig. 1 (continuación)**





**Fig. 2**

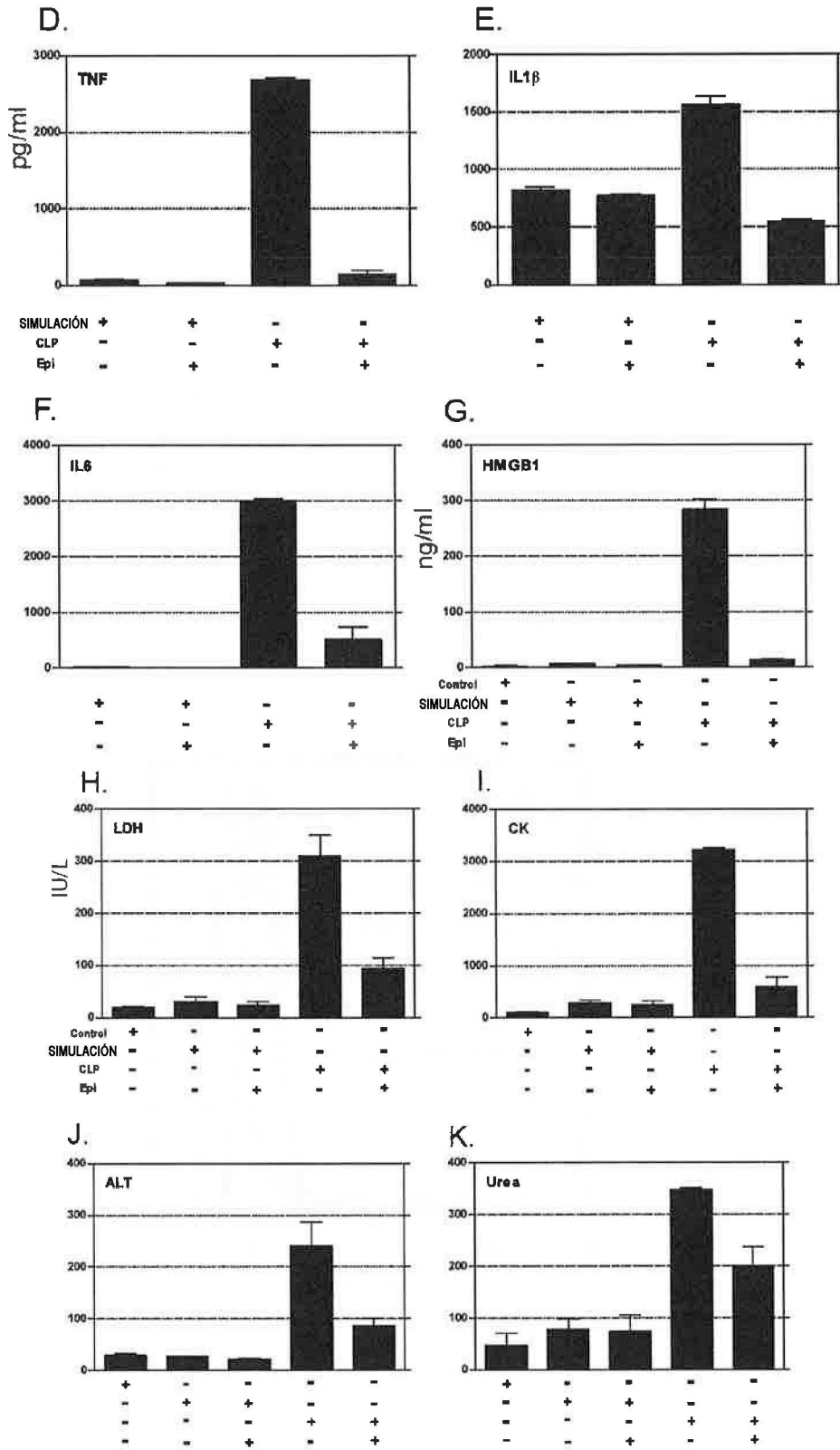


Fig. 2 (continuación)

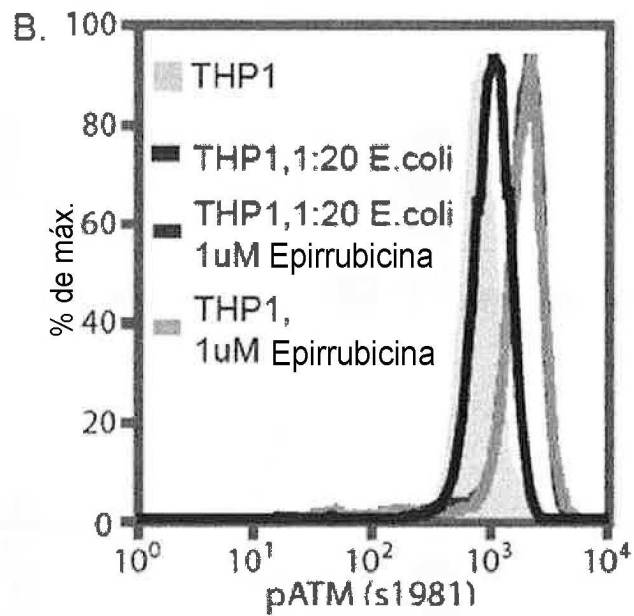
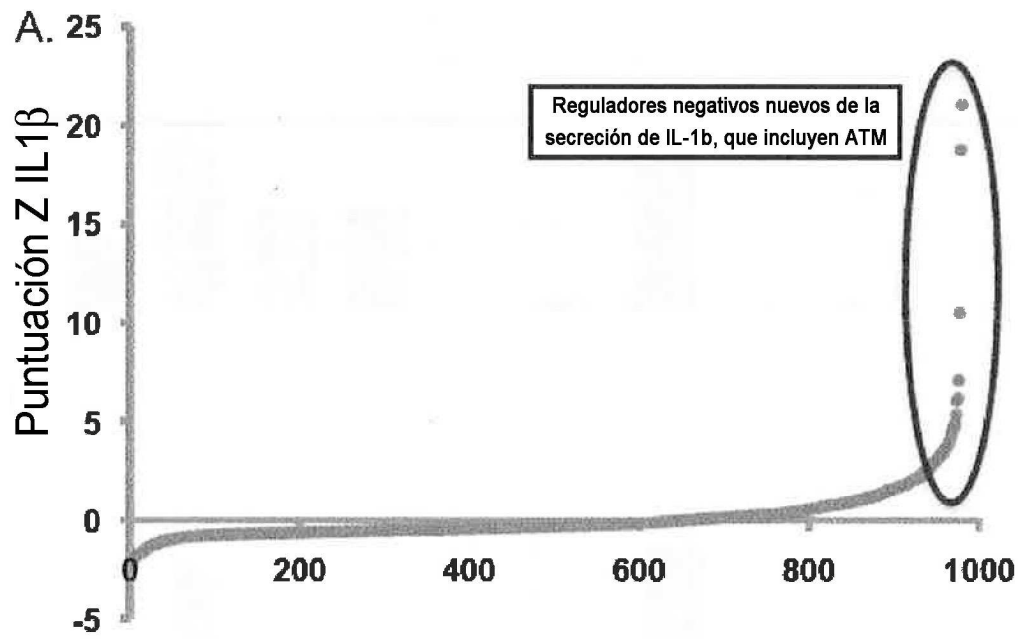


Fig. 3

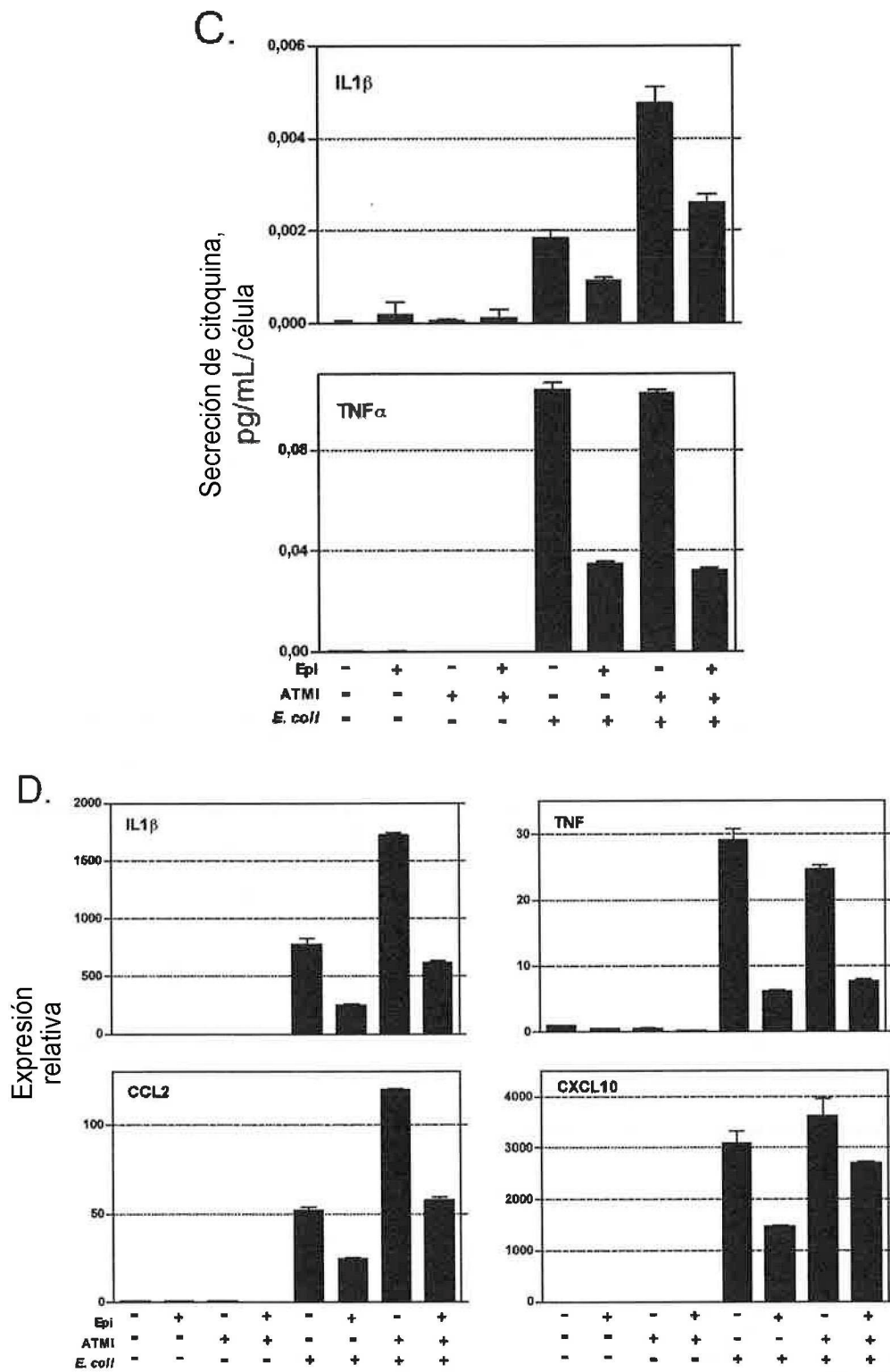
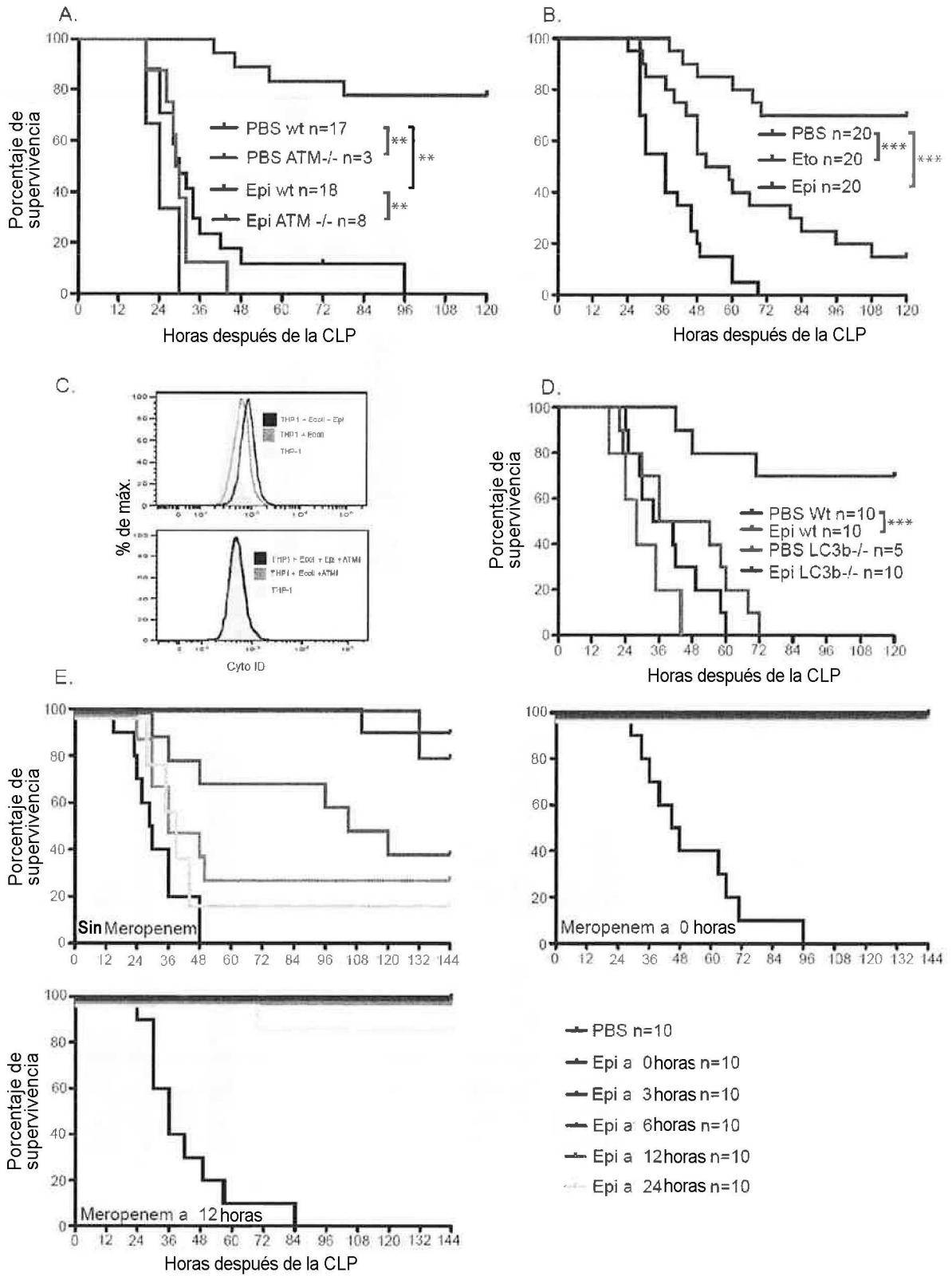
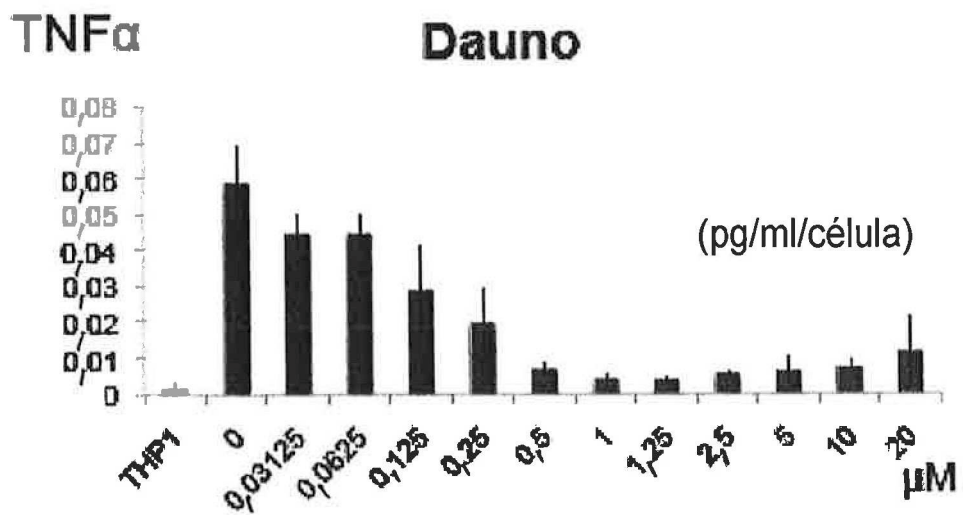
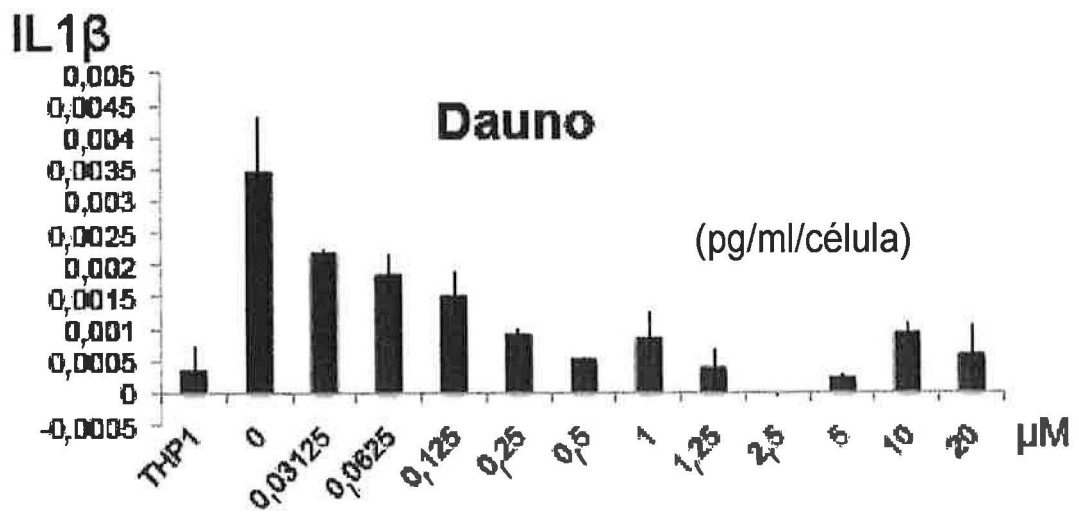


Fig. 3 (continuación)

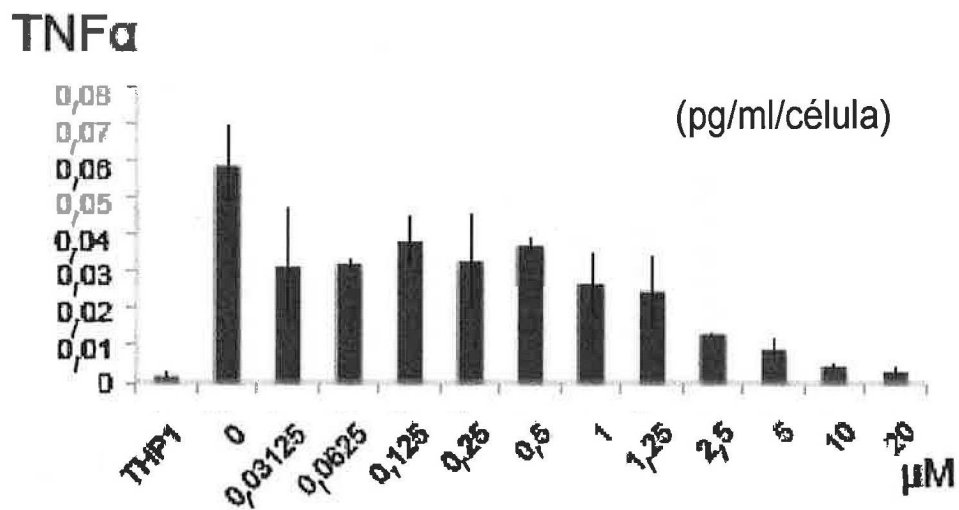
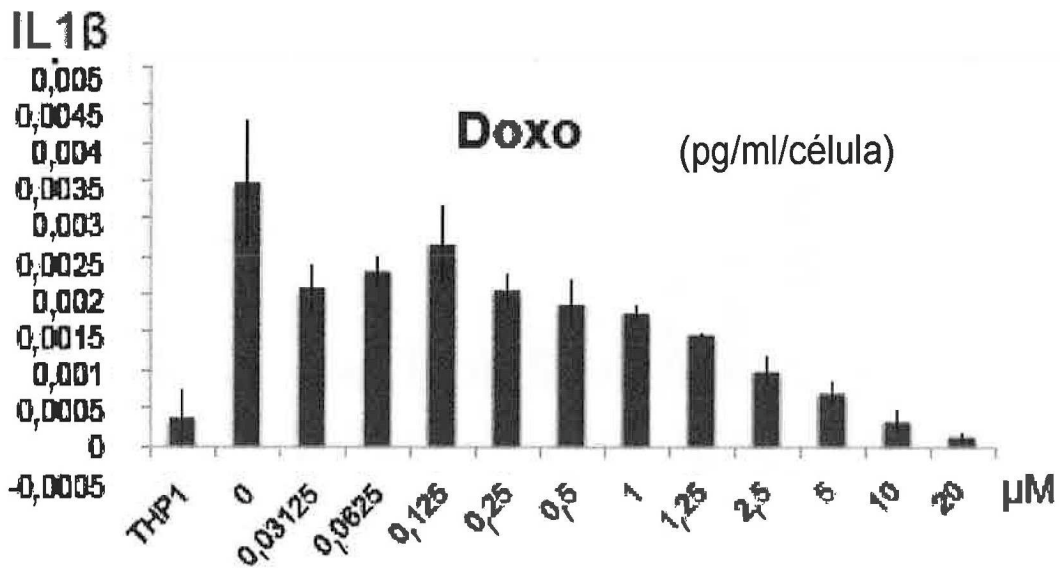


**Fig. 4**



**Fig. 5**





**Fig. 5 (continuación)**

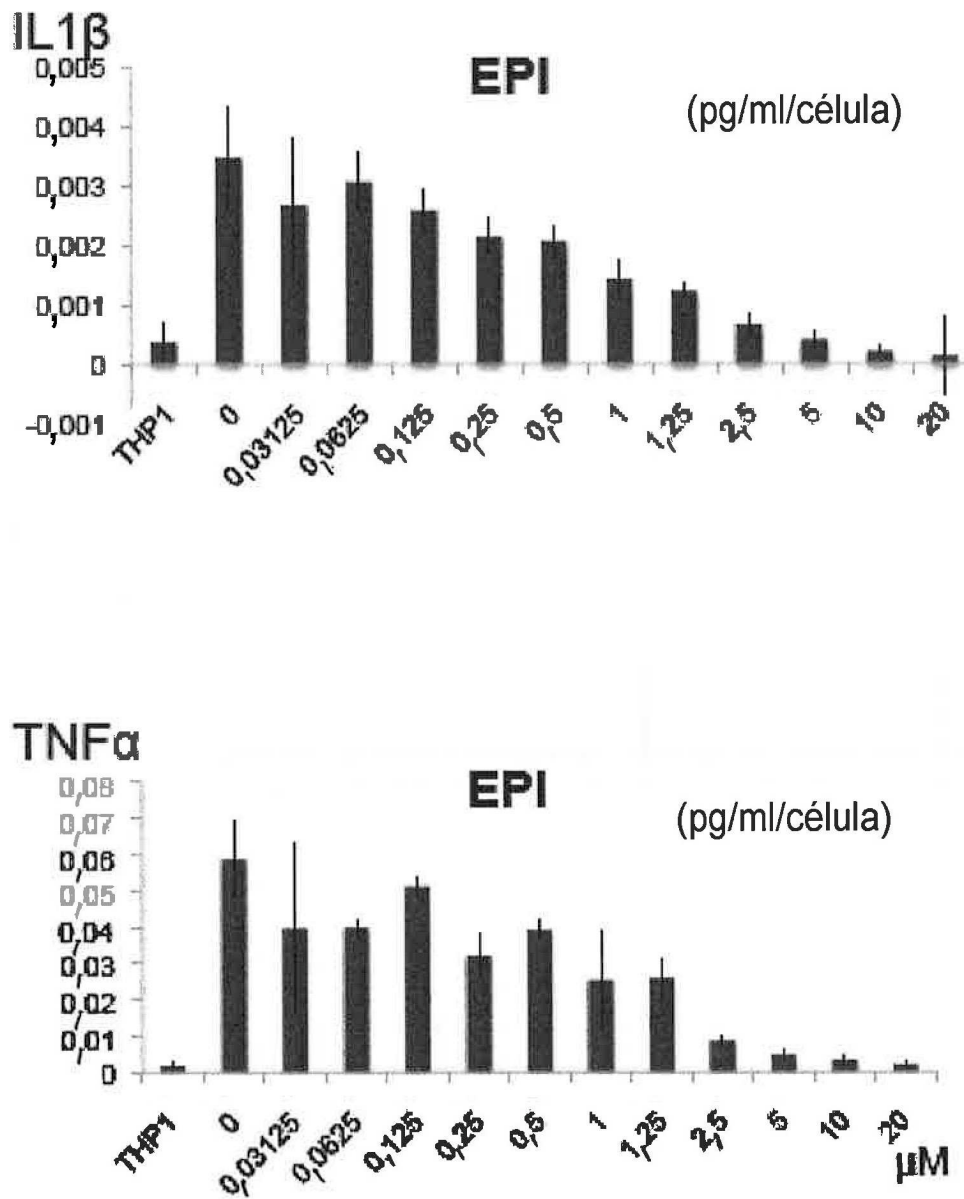


Fig. 5 (continuación)

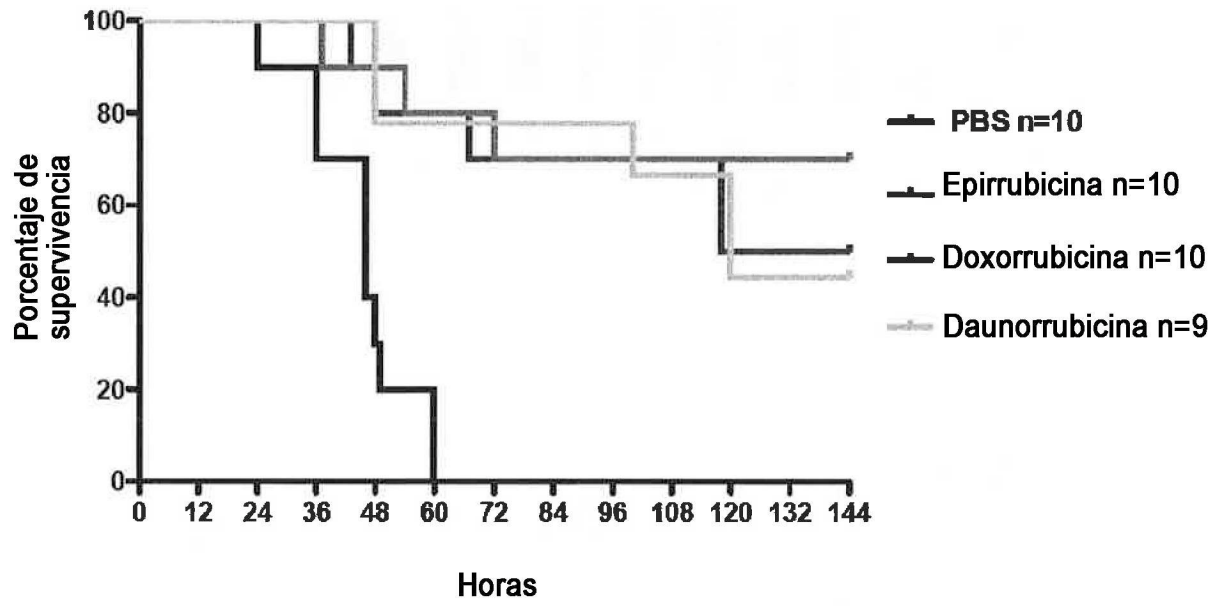


Fig. 6

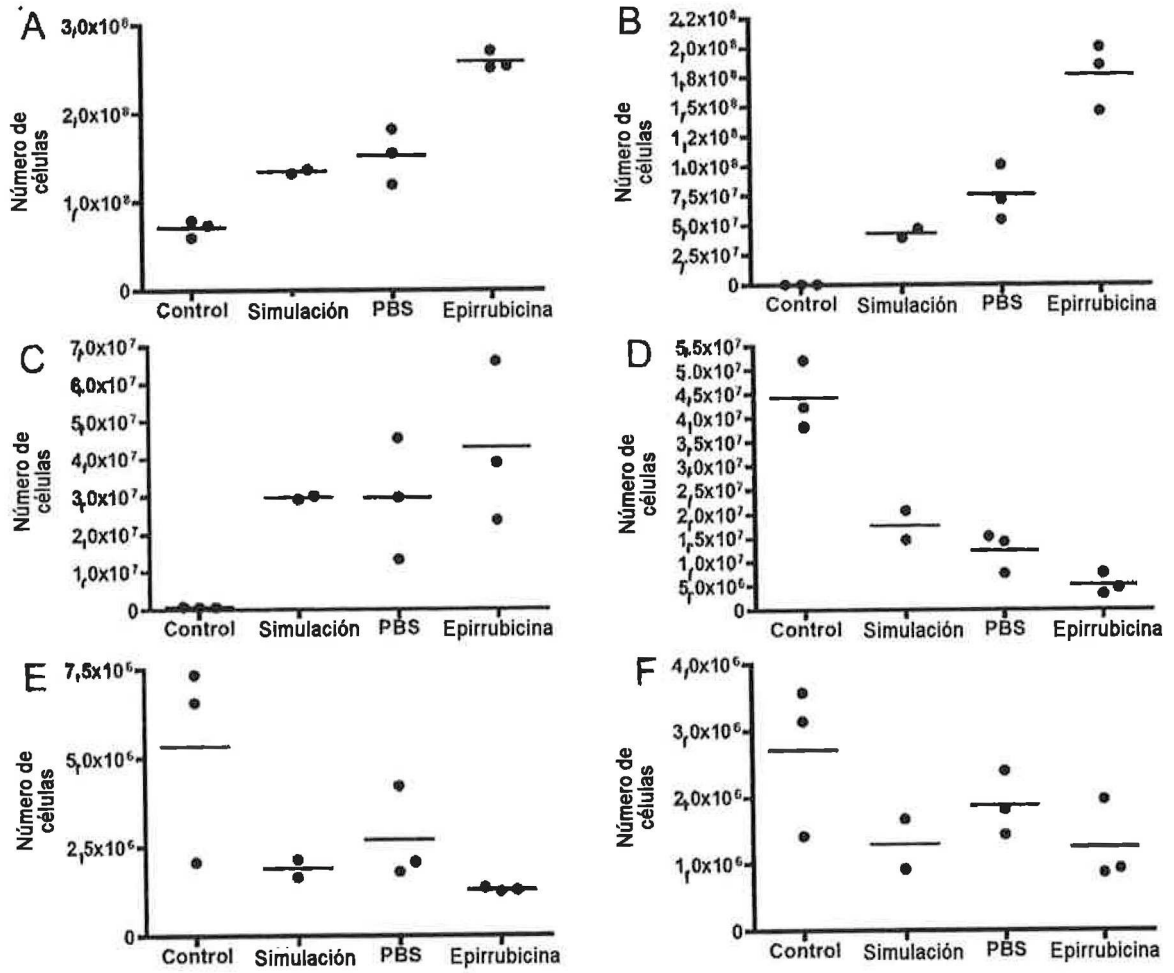


Fig. 7

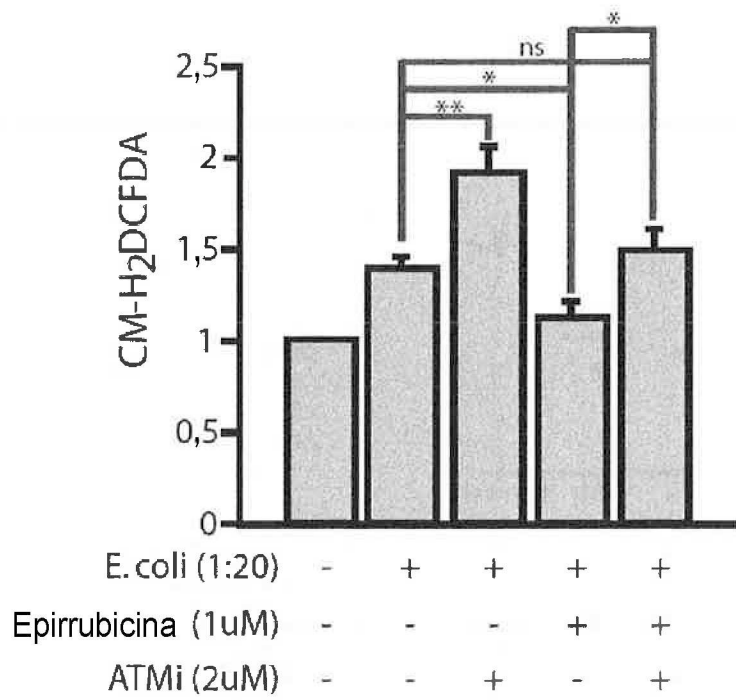


Fig. 8

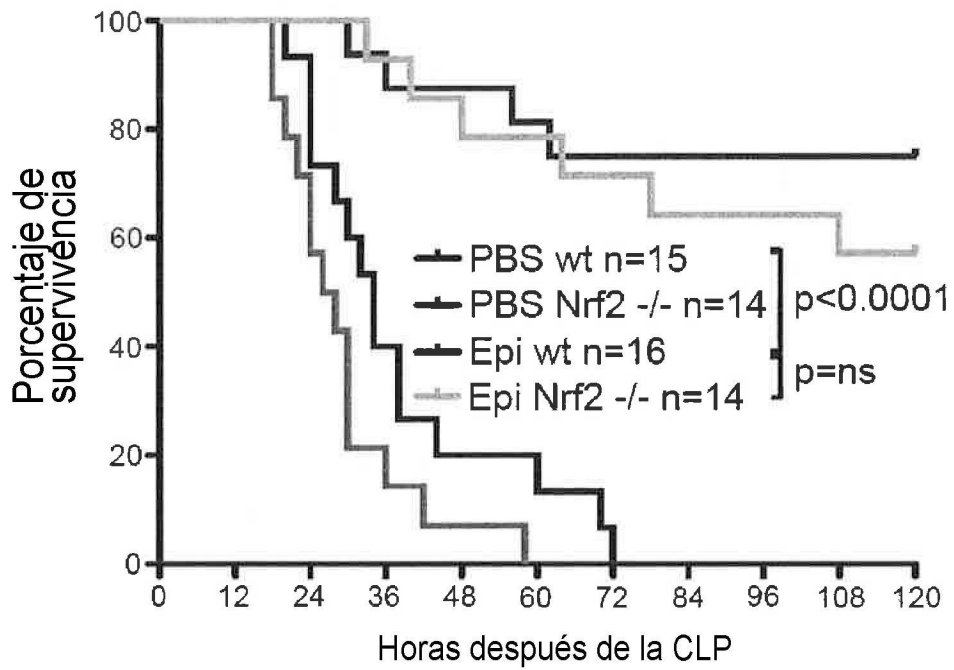


Fig. 9

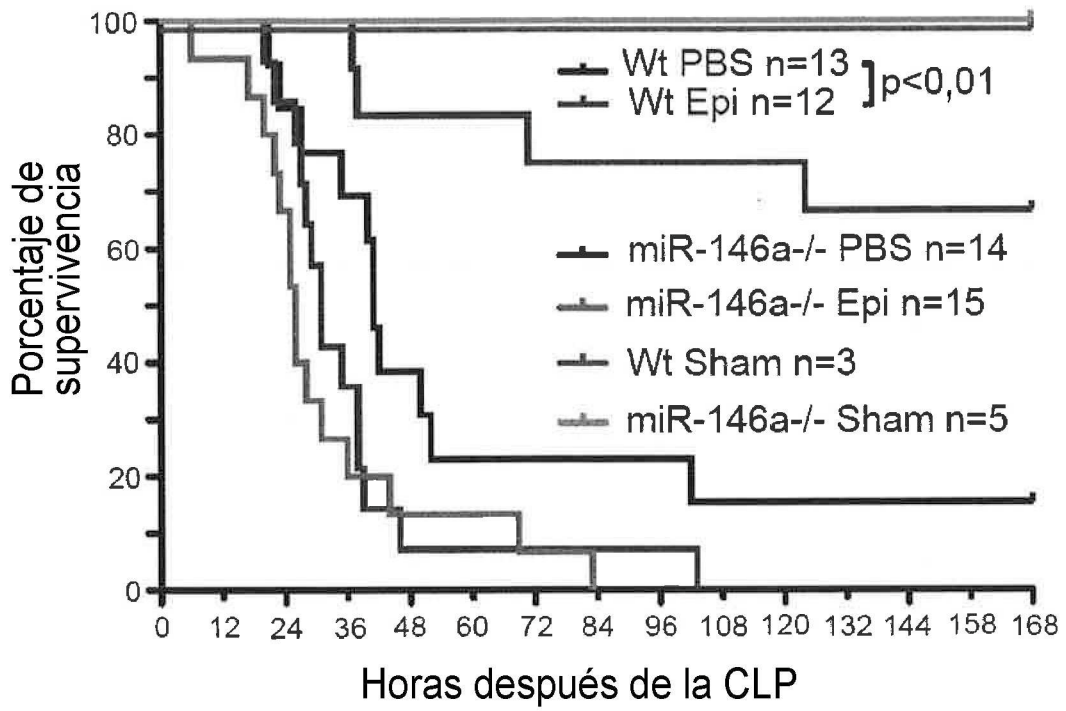


Fig. 10

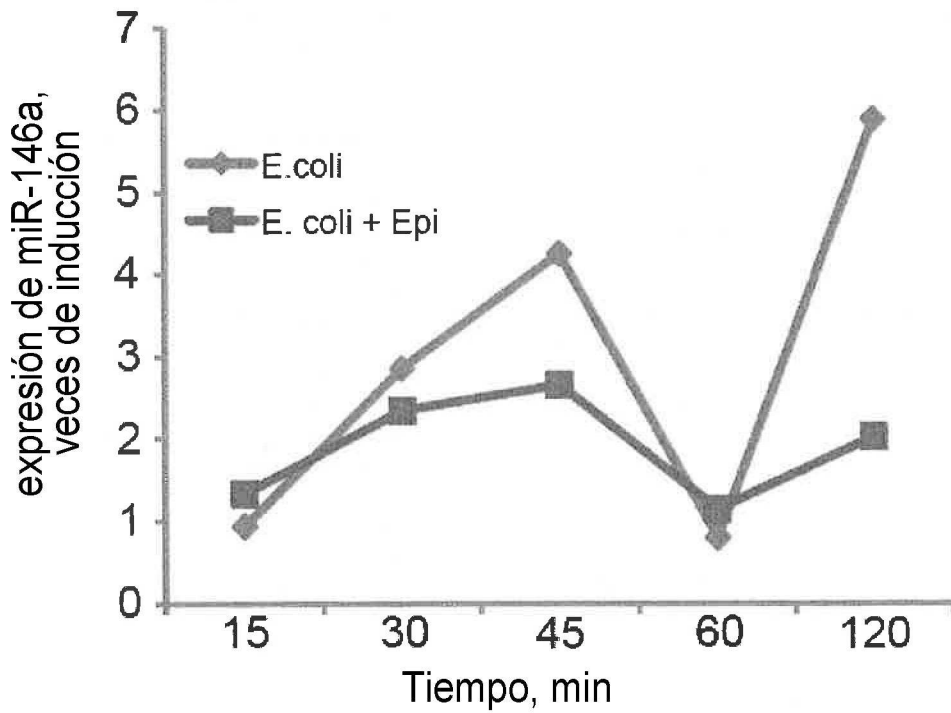


Fig. 11