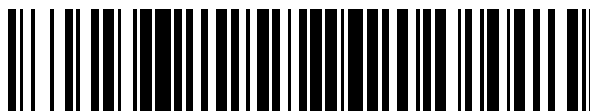


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 532**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 33/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2014** **PCT/US2014/063347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015** **WO15066426**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2014** **E 14800207 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 3062811**

54 Título: **Intervenciones basadas en angiopoyetina para el tratamiento de la malaria cerebral**

30 Prioridad:

01.11.2013 US 201361898539 P

22.08.2014 US 201462040514 P

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

16.10.2019

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

777 Old Saw Mill River Road

Tarrytown, NY 10591, US y

UNIVERSITY HEALTH NETWORK (UHN) (50.0%)

72 Inventor/es:

PURCELL NGAMBO, LISA ARLEEN;

HIGGINS, SARAH, J. y

KAIN, KEVIN, C.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 727 532 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

Intervenciones basadas en angiopoyetina para el tratamiento de la malaria cerebral

5 Campo de la invención Antecedentes

La malaria cerebral es una causa importante de morbilidad y mortalidad global, caracterizada normalmente por la pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica y el deterioro neurológico, seguidos de la muerte en el 15-30 % de los casos a pesar del tratamiento. La malaria cerebral en seres humanos es causada por *Plasmodium falciparum*. Los síntomas típicos de la malaria cerebral incluyen fiebre, cefalea y mialgia seguidos de somnolencia, confusión, deterioro del equilibrio o la coordinación, deterioro motor, coma y muerte. Las opciones de tratamiento actualmente se limitan a los derivados de quinina o artemisinina, que controlan la parasitemia, pero no son tan efectivos para reducir la mortalidad. Por consiguiente, existe una necesidad no satisfecha en la técnica de enfoques terapéuticos y preventivos eficaces sin efectos secundarios adversos que prevengan o traten la malaria cerebral.

Breve resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas estrictamente de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de al menos un síntoma, indicación o complicación de la malaria cerebral (incluyendo, por ejemplo, malaria cerebral experimental, malaria por *falciparum*, etc.) en un sujeto.

En determinadas realizaciones, el al menos un síntoma, indicación o complicación se selecciona del grupo que consiste en fiebre, cefalea y mialgia seguidos de somnolencia, confusión, fuga vascular, pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica, nivel sanguíneo elevado de un marcador endotelial, secuestro de eritrocitos parasitados en el cerebro, deterioro del equilibrio o la coordinación, deterioro motor, esplenomegalia, pérdida de reflejos y autoconservación, falta de comportamiento relacionado con la higiene, lesión pulmonar aguda, convulsiones, coma y muerte. En determinadas realizaciones, el marcador endotelial se selecciona del grupo que consiste en angiopoyetina-1 (Ang1), angiopoyetina-2 (Ang2), receptor de angiopoyetina Tie2, factor de von Willebrand (vWF), molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), IP-10, E-selectina y molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1).

De acuerdo con otro aspecto, se proporcionan métodos para mejorar o aumentar la supervivencia de un sujeto después de una infección por *Plasmodium*. Los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína angiopoyetina o angiopoyetina modificada o un fragmento de la misma al sujeto que lo necesite. En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona métodos para prevenir la fuga vascular o proteger la integridad de la barrera hematoencefálica, comprendiendo el método administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína angiopoyetina modificada o un fragmento de la misma a un sujeto que lo necesite.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para prevenir la malaria cerebral grave en un sujeto infectado con *Plasmodium* spp., comprendiendo el método seleccionar un sujeto con más del 0,1 % de parasitemia; y administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína angiopoyetina modificada o un fragmento de la misma al sujeto que lo necesite.

En determinadas realizaciones, la administración de la angiopoyetina modificada a un sujeto que lo necesite previene al menos una indicación de deterioro neurológico seleccionada del grupo que consiste en deterioro del equilibrio o la coordinación, deterioro motor, pérdida de reflejos y autoconservación, lesión neurocognitiva a largo plazo y deterioro que incluye deficiencias de memoria y trastornos afectivos, falta de comportamiento relacionado con la higiene, convulsiones y crisis epilépticas o espasmos.

En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada se administra en combinación con un segundo agente terapéutico o terapia. En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada se administra como terapia adyuvante junto con un segundo agente terapéutico tal como, por ejemplo, artesunato.

Las moléculas de angiopoyetina ejemplares que se pueden usar en el contexto de los métodos incluyen, por ejemplo, angiopoyetina-1, angiopoyetina recombinante (por ejemplo, angiopoyetina-1 expresada en un vector adenoviral) y una angiopoyetina modificada (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una angiopoyetina o un fragmento de la misma). De acuerdo con determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada es una proteína de fusión que consiste en el dominio similar a fibrinógeno de la angiopoyetina fusionado al fragmento Fc de IgG1 humana y luego forzada a un tetrámero (Davis et al 2003, Nat. Struct. Biol. 10: 38-44). En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada comprende una proteína de fusión que comprende un primer dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un fragmento Fc y el fragmento Fc fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un segundo dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina.

Uno de estos tipos de angiopoyetina modificada que se puede usar en el contexto de los métodos de la presente invención es AngF1-Fc-F1 (SEQ ID NO: 2).

En otro aspecto, la presente divulgación incluye métodos para tratar, prevenir o mejorar al menos un síntoma, indicación o complicación de la malaria cerebral (incluyendo, por ejemplo, malaria cerebral experimental, malaria por falciparum, etc.) en un sujeto. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Tie2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto que lo necesite. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-Tie2 es un anticuerpo activador o agonista.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** muestra las curvas de supervivencia de ratones C57Bl/6 (susceptibles a la malaria cerebral experimental; ECM-S) y BALB/c (resistentes a la malaria cerebral experimental; ECM-R) infectados con *Plasmodium berghei* ANKA (PbA).

La **figura 2** muestra el porcentaje de cambio en veces en la puntuación rápida de coma y comportamiento murino (RMCBS) en ratones ECM-S y ECM-R infectados con PbA.

La **figura 3** muestra niveles comparativos de colorante azul de Evans extraído de los cerebros de ratones ECM-R y ECM-S infectados con PbA.

La **figura 4** muestra el porcentaje de parasitemia en ratones ECM-S y ECM-R infectados con PbA.

La **figura 5** muestra los niveles séricos de Ang-1 en el transcurso de la infección por PbA. ***p <0,0001 (tiempo), *p<0,05 (cepa) y **p <0,001 (ANOVA bidireccional con prueba posterior de Bonferroni para la comparación indicada).

Figura 6(a) RMCBS (%) y niveles séricos de Ang-1 (ng/ml) *p<0,05 en comparación con el ANOVA unidireccional, sin tratamiento previo. La **figura 6(b)** representa gráficos de dispersión que muestran el análisis de regresión lineal entre los niveles séricos de Ang1 (ng/ml) y el tiempo hasta la muerte (horas) (correlación de Spearman, valor r, p<0,0001).

La **figura 7** muestra los niveles relativos de proteína Ang2 en ratones ECM-R y ECM-S tras la infección por PbA.

La **figura 8** muestra los niveles de proteína vWF en ratones ECM-R y ECM-S en el día 6 posterior a la infección con PbA.

La **figura 9** muestra los niveles relativos de ARNm de Tie2 en ratones ECM-R y ECM-S tras la infección por PbA.

La **figura 10** muestra las curvas de supervivencia de ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con anticuerpo anti-Ang2 (mAb 'B'), control de isotipo (mAb 'A') o solución salina.

La **figura 11** muestra el porcentaje de cambio en veces en la RMCBS en ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con anticuerpo anti-Ang2 (mAb 'B'), control de isotipo (mAb 'A') o solución salina.

La **figura 12** muestra el porcentaje de parasitemia en el día 7 después de la infección por PbA en ratones C57Bl/6 tratados con anticuerpo anti-Ang2 (mAb 'B'), control de isotipo (mAb 'A') o solución salina.

La **figura 13** muestra los niveles de proteína plasmática de (a) vWF y (b) E-selectina, ICAM y VCAM en ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo (barras rayadas) o ratones infectados con PbA y tratados con anticuerpo anti-Ang2 (mAb 'B') (barras grises) o control de isotipo (mAb 'A') (barras negras).

La **figura 14** muestra las curvas de supervivencia de ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con AngF1-Fc-F1, control con Fc, anticuerpo anti-Ang2, un anticuerpo doble Anti-Ang1/Ang2 ("comparador") o solución salina.

La **figura 15** muestra el porcentaje de parasitemia en ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con AngF1-Fc-F1, control con Fc, anticuerpo anti-Ang2, un anticuerpo doble Anti-Ang1/Ang2 ("comparador") o solución salina.

La **figura 16(a)** muestra los niveles de colorante azul de Evans extraído de los cerebros de ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con control con Fc (A), anticuerpo anti-Ang2 (B), AngF1-Fc-F1 (C), o anticuerpo comparador anti-Ang1/Ang2 (D). La **figura 16(b)** muestra el porcentaje de parasitemia en ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con control con Fc (A), anticuerpo anti-Ang2 (B), AngF1-Fc-F1 (C) o anticuerpo "comparador" anti-Ang1/Ang2 (D).

La **figura 17(a)** muestra el porcentaje de cambio en RMCBS en día 6 tras la infección por PbA en ratones C57Bl/6 tratados con AngF1-Fc-F1 o control de isotipo. La **figura 17(b)** muestra el porcentaje de cambio durante 7 días en RMCBS en ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con AngF1-Fc-F1 o control de isotipo.

La **figura 18(a)** muestra el porcentaje de parasitemia en ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con AngF1-Fc-F1 o control de isotipo. La **figura 18(b)** muestra el porcentaje de cambio en veces en el peso de ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con AngF1-Fc-F1 o control de isotipo.

La **figura 19** muestra los niveles de proteína plasmática de las citocinas TNF α e IFN γ (a), vWF (b), E-selectina, sICAM y VCAM-1 (c) de ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo y ratones infectados con PbA y tratados con AngF1-Fc-F1 o control con Fc.

La **figura 20** muestra las curvas de supervivencia de ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con artesunato + AngF1-Fc-F1, artesunato + solución salina, o solución salina.

La **figura 21(a)** muestra el porcentaje de parasitemia en ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con artesunato + AngF1-Fc-F1 o artesunato + solución salina. La **figura 21(b)** muestra el porcentaje de cambio en veces en el peso de ratones C57Bl/6 infectados con PbA y tratados con artesunato + AngF1-Fc-F1 o artesunato + solución salina.

Descripción detallada

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a los métodos ni a las condiciones experimentales descritos en particular, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar del valor indicado en no más de un 1 %. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores intermedios (por ejemplo, 99,1, 99,2: 99,3, 99,4, etc.).

Aunque pueden utilizarse en la práctica de la presente invención cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

Métodos para el tratamiento, la prevención o la mejora de la malaria cerebral

La patogenia de la malaria cerebral se asocia con la activación endotelial y la pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica. La vía de señalización de angiopoyetina-Tie2 es un regulador clave de la función endotelial. Las alteraciones en el equilibrio angiogénico, específicamente el aumento de angiopoyetina-2 (Ang2) con respecto a Ang1, se han asociado con un desenlace clínico deficiente en la malaria cerebral (Yeo et al, 2008 PNAS; Lovegrove et al PLoS ONE 2009; Erdman et al PLoS ONE 2011; Conroy et al PLoS ONE 2011). Sin embargo, no está claro si la vía de Ang-Tie2 está causalmente implicada en la patogenia de la malaria cerebral. Los inventores han planteado la hipótesis de que la desregulación en las angiopoyetinas contribuye a la patogenia de la malaria cerebral y, por lo tanto, las intervenciones para mantener la activación de Tie2 pueden promover la estabilidad endotelial, prevenir efectos perjudiciales para la barrera hematoencefálica y mejorar el desenlace después de la infección por *Plasmodium*. Por consiguiente, se muestra en el presente documento, que las angiopoyetinas modificadas, cuando se administran a un sujeto infectado, protegen la integridad de la barrera hematoencefálica y previenen el deterioro neurológico y la muerte. Como se desvela en otra parte en el presente documento, los inventores han usado un modelo murino bien conocido de malaria cerebral experimental (ECM) inducida por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) para estudiar las alteraciones en las angiopoyetinas asociadas con la gravedad de la enfermedad y la letalidad y para demostrar que la desregulación del eje Ang/Tie2 está asociada con la gravedad de la enfermedad y la letalidad. Como se muestra en el presente documento, los niveles de Ang1 se correlacionan inversamente con la morbilidad y la mortalidad en el modelo en ratón de malaria cerebral. Basándose en los estudios mostrados en el presente documento, se establece que Ang1 es necesaria para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica en respuesta a una exposición letal de malaria y puede mejorar la supervivencia por encima de la lograda con el tratamiento convencional (por ejemplo, artesunato) solo. Además, la administración de una angiopoyetina modificada mejoró la integridad de la barrera hematoencefálica y promovió el mantenimiento de un endotelio inactivo mediante la regulación negativa de moléculas proadhesivas implicadas en el secuestro de parásitos y la patogenia de la malaria cerebral.

Por consiguiente, la presente divulgación incluye métodos para tratar, prevenir o mejorar al menos un síntoma, indicación o complicación de la malaria cerebral (incluyendo, por ejemplo, malaria cerebral experimental, malaria por falciparum, etc.) en un sujeto. Los métodos de acuerdo con este aspecto comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína angiopoyetina modificada o un fragmento de la misma al sujeto que lo necesite.

La "malaria cerebral" (CM), como se usa en el presente documento, significa una enfermedad infecciosa causada por especies de *Plasmodium* y caracterizada por la pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica y el deterioro neurológico. Los síntomas de la CM incluyen, pero sin limitación, fiebre, cefalea y mialgia seguidos de somnolencia, confusión, fuga vascular, pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica, nivel sanguíneo elevado de un marcador endotelial, secuestro de eritrocitos parasitados en el cerebro, deterioro del equilibrio o la coordinación, deterioro motor, esplenomegalia, pérdida de reflejos y autoconservación, falta de comportamiento relacionado con la higiene, lesión pulmonar aguda, convulsiones, crisis epilépticas, coma y muerte. La clínicaopatología de la CM se caracteriza por el secuestro de glóbulos rojos infectados en las vénulas y capilares del cerebro, seguido de activación endotelial. El término "malaria cerebral" incluye, entre otros, la malaria cerebral grave causada en seres humanos por *Plasmodium falciparum* y la malaria cerebral experimental (ECM), causada en ratones por *Plasmodium berghei* ANKA.

Como se usan en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" o similares, significan aliviar un síntoma o una complicación, eliminar la causa de un síntoma o una complicación de forma temporal o permanente, o prevenir o retardar la aparición de un síntoma o complicación de la malaria cerebral en el sujeto. En el contexto de la presente invención, los términos "tratar", "tratamiento" o similares, se refieren a reducir o disminuir la mortalidad en

- un sujeto infectado con especies de *Plasmodium*. Los términos también se refieren a prevenir la pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica y el deterioro neurológico en un sujeto con malaria cerebral. En determinadas realizaciones, los métodos actuales son útiles para tratar o mejorar al menos un síntoma, indicación o complicación de la malaria cerebral incluyendo, pero sin limitación, fiebre, cefalea y mialgia seguidos de
- 5 somnolencia, confusión, fuga vascular, pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica, nivel sanguíneo elevado de un marcador endotelial, secuestro de eritrocitos parasitados en el cerebro, deterioro del equilibrio o la coordinación, deterioro motor, esplenomegalia, pérdida de reflejos y autoconservación, falta de comportamiento relacionado con la higiene, lesión pulmonar aguda, convulsiones, crisis epilépticas, coma y muerte.
- 10 Por la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá del objetivo del tratamiento, y serán discernibles por un experto en la materia usando las técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, que exhibe uno o más síntomas, indicaciones o complicaciones de malaria cerebral, y/o al que se la ha diagnosticado malaria cerebral (CM) y/o que necesita una mejora, prevención y/o tratamiento de malaria cerebral. La expresión "un sujeto que lo necesite" también puede incluir, por ejemplo, sujetos que, antes del tratamiento, exhiben (o han exhibido) uno o más síntomas o indicaciones de malaria cerebral tales como, por ejemplo, fiebre, cefalea y
- 20 mialgia seguidos de somnolencia, confusión, fuga vascular, pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica, nivel sanguíneo elevado de un marcador endotelial, secuestro de eritrocitos parasitados en el cerebro, deterioro del equilibrio o la coordinación, deterioro motor, esplenomegalia, pérdida de reflejos y autoconservación, falta de comportamiento relacionado con la higiene, lesión pulmonar aguda, convulsiones, crisis epilépticas, coma y muerte.
- 25 En el contexto de la presente invención, "un sujeto que lo necesite" puede incluir un subconjunto de población, que puede mostrar un nivel elevado de un marcador endotelial. Dicha población de sujetos puede mostrar un nivel elevado de un marcador endotelial tal como, por ejemplo, Ang1, Ang2, Tie2, vWF, ICAM-1, E-selectina y VCAM-1.
- 30 Los métodos de la presente invención se pueden usar para tratar la malaria cerebral en adultos, incluyendo los ancianos. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención se usan para tratar a adultos de más de 50 años, más de 55 años, más de 60 años, más de 65 años o más de 70 años.
- En algunas realizaciones, los métodos en el presente documento se pueden usar para tratar la malaria cerebral en niños que tienen ≤ 3 años de edad. Por ejemplo, los presentes métodos se pueden usar para tratar lactantes que
- 35 tienen menos de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses o menos de 12 meses de edad. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención se pueden usar para tratar niños que tienen más de 3 años de edad, más de 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 11 años, 12 años, 13 años, 14 años, o más de 15 años de edad.
- 40 La presente divulgación también incluye métodos para aumentar la supervivencia en un sujeto con malaria cerebral. Los métodos de acuerdo con este aspecto comprenden administrar al sujeto una o más dosis de una composición farmacéutica que comprende una angiopoyetina modificada para aumentar la supervivencia en el sujeto.
- 45 La presente divulgación también incluye métodos para prevenir la malaria cerebral grave en un sujeto infectado con especies de *Plasmodium*, comprendiendo los métodos administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una angiopoyetina modificada al sujeto que lo necesite. En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada se administra como una proteína exógena.
- 50 El término "prevenir" como se usa en el presente documento se refiere a prevenir el desarrollo de una enfermedad. El término, como se usa en el presente documento, también incluye prevenir la fuga vascular, proteger la integridad de la barrera hematoencefálica y la aparición de síntomas neurológicos, tales como espasmos y parálisis tras la infección con el patógeno. En algunas realizaciones, el término se refiere a prevenir la disfunción endotelial, que es una característica patológica clave de la malaria cerebral (incluyendo la malaria cerebral experimental).
- 55 La presente divulgación incluye métodos para tratar, prevenir o reducir la gravedad de la malaria cerebral, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una angiopoyetina modificada a un sujeto que lo necesite, en los que la composición farmacéutica se administra al sujeto en dosis múltiples, por ejemplo, como parte de un régimen de dosificación terapéutica específica. Por ejemplo,
- 60 el régimen de dosificación terapéutica puede comprender administrar múltiples dosis de la composición farmacéutica al sujeto con una frecuencia de aproximadamente una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez cada cuatro días, una vez cada cinco días, una vez cada seis días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses o con menos frecuencia. En algunas realizaciones, el régimen de dosificación terapéutica comprende administrar múltiples dosis de la composición farmacéutica al sujeto con una
- 65 frecuencia de aproximadamente una vez al día, aproximadamente 2 veces al día, aproximadamente 3 veces al día o más de 4 veces al día.

En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada se administra por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intracraneal, por vía intraventricular, o se administra por vía sistémica en un vector adenoviral a un sujeto que lo necesite.

- 5 Los métodos de acuerdo con determinadas realizaciones, comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una angiopoyetina modificada en combinación con un segundo agente terapéutico. El segundo agente terapéutico puede ser un agente seleccionado del grupo que consiste en una artemisinina, quinina o una variante o derivado de las mismas (por ejemplo, artesunato), un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [por ejemplo, una "Trampa de VEGF" tal como aflibercept u otra proteína de fusión que inhibe el VEGF como se expone en el documento US 7.087.411, o un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, bevacizumab o ranibizumab)], un anticuerpo activador anti-Tie2, un antagonista Ang2, un antihistamínico y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Como se usa en el presente documento, la frase "en combinación con" significa que la composición farmacéutica que comprende una angiopoyetina modificada se administra al sujeto al mismo tiempo que, justo antes o justo después de la administración del segundo agente terapéutico. En determinadas realizaciones, el segundo agente terapéutico se administra como una coformulación con la angiopoyetina modificada.

- 20 La presente divulgación también se refiere a métodos para tratar, prevenir o mejorar al menos un síntoma, indicación o complicación de la malaria cerebral en un sujeto, en los que los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-Tie2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo al sujeto que lo necesite. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-Tie2 es un anticuerpo activador o agonista, por ejemplo, el anticuerpo al unirse a Tie2 aumenta la actividad de Tie2 o estimula de otro modo la señalización de Tie2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-Tie2 es un anticuerpo como se expone en el documento US20130209492. El anticuerpo anti-Tie2 se puede administrar por vía subcutánea, por vía intravenosa o por vía intracraneal a una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg del peso corporal del sujeto. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-Tie2 activador se administra en combinación con un segundo anticuerpo anti-Tie2 activador al sujeto que lo necesite.

- 30 En otro aspecto, la presente divulgación incluye métodos para tratar, prevenir o mejorar al menos un síntoma, indicación o complicación de una enfermedad o trastorno asociado con la disfunción de la vía de Ang-Tie2 en un sujeto. Los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína angiopoyetina modificada o un fragmento de la misma al sujeto que lo necesite. En determinadas realizaciones, la angiopoyetina o variantes de la misma se pueden usar para tratar, prevenir o mejorar al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno que incluye malaria cerebral, sepsis, ántrax, dengue, fiebre hemorrágica (incluyendo fiebre hemorrágica viral, por ejemplo, fiebre de Lassa, fiebre amarilla y fiebre del Ébola), síndrome de choque tóxico, SUH, choque hemorrágico (modelo de pérdida masiva de sangre debido a una lesión traumática, por ejemplo, DEI), reperfusión isquémica, síndrome urémico hemolítico, infarto de miocardio y apoplejía.

40

Angiopoyetinas modificadas

- Los métodos de la presente divulgación comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una composición terapéutica que comprende una angiopoyetina o una variante de la misma. Como se usa en el presente documento, una "angiopoyetina" incluye angiopoyetina-1 (Ang1) o angiopoyetina-2 (Ang2).

- Los ejemplos no limitantes de categorías de angiopoyetinas modificadas incluyen angiopoyetinas recombinantes (por ejemplo, angiopoyetina expresada en un vector adenoviral; Thurston et al 2000, Nat. Med.), formas mutantes y quiméricas de angiopoyetinas y proteínas de fusión que comprenden angiopoyetina o un fragmento de la misma que se unen específicamente a los receptores Tie1 y/o Tie2.

- De acuerdo con determinadas realizaciones ejemplares de la presente divulgación, la angiopoyetina modificada es una proteína de fusión que comprende uno o más dominios de la molécula de angiopoyetina fusionada a un dominio de multimerización. En términos generales, el o los dominios de multimerización de la presente invención funcionan para conectar los diversos componentes de la molécula de angiopoyetina (por ejemplo, los dominios similares a fibrinógeno) entre sí. Como se usa en el presente documento, un "dominio de multimerización" es cualquier macromolécula que tiene la capacidad de asociarse (covalentemente o no covalentemente) con una segunda macromolécula de estructura o constitución igual o similar. Por ejemplo, un dominio de multimerización puede ser un polipéptido que comprende un dominio C_{H3} de inmunoglobulina. Un ejemplo no limitante de un dominio de multimerización es una parte Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc de una IgG seleccionada de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipos. En determinadas realizaciones, el dominio de multimerización es un fragmento Fc o una secuencia de aminoácidos de 1 a aproximadamente 200 aminoácidos de longitud que contiene al menos un residuo de cisteína. En otras realizaciones, el dominio de multimerización es un residuo de cisteína o un péptido corto que contiene cisteína. Otros dominios de multimerización incluyen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en una cremallera de leucina, un motivo de hélice-bucle o un motivo de superhélice.

En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada es una proteína de fusión que comprende uno o más dominios similares a fibrinógeno de la molécula de angiopoyetina-1 fusionada al fragmento Fc de una inmunoglobulina que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos, como se expone en la Patente de Estados Unidos No. 7.008.781. En determinadas realizaciones ejemplares, la proteína de fusión que se puede usar en el contexto de los métodos de la presente invención comprende un primer dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un fragmento Fc de IgG y el extremo C-terminal del fragmento Fc fusionado al extremo N-terminal de un segundo dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina (Davis et al, Nat. Struct. Biol. 2003), en la que la angiopoyetina es Ang1. De acuerdo con determinadas realizaciones ejemplares, los métodos de la presente invención comprenden el uso de la angiopoyetina modificada denominada y conocida en la técnica como AngF1-Fc-F1. En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada es un dímero que comprende dos AngF1-Fc-F1s que se asocian a través de la asociación intramolecular de los fragmentos Fc (también denominados BowAng1, como se desvela en Davis et al, Nat. Struct. Biol. 2003). De acuerdo con determinadas realizaciones, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Otras angiopoyetinas modificadas que se pueden usar en el contexto de los métodos de la presente invención incluyen cualquiera de las moléculas de angiopoyetina modificadas como se expone en las patentes de Estados Unidos No. 6265564, 6441137 y 6825008.

En determinadas realizaciones, la angiopoyetina o variantes de la misma se pueden usar para tratar, prevenir o mejorar al menos un síntoma o indicación de una enfermedad o trastorno que incluye sepsis, dengue, fiebre hemorrágica (incluyendo fiebre hemorrágica viral, por ejemplo, fiebre de Lassa, fiebre amarilla y fiebre del Ébola), síndrome de choque tóxico, SUH, choque hemorrágico (modelo de pérdida masiva de sangre debido a una lesión traumática, por ejemplo, DEI), reperfusión isquémica, síndrome urémico hemolítico, infarto de miocardio y apoplejía.

Composiciones farmacéuticas

La presente divulgación incluye métodos que comprenden administrar una angiopoyetina modificada a un sujeto, en los que la angiopoyetina modificada está contenida dentro de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que proporcionan una transferencia, administración, tolerancia y similares adecuadas. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido para todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Véase también, Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en embolada, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede suministrarse por vía subcutánea o intravenosa con una aguja y una jeringa convencionales. Además, con respecto al administración subcutánea, un dispositivo de administración de pluma preparado tiene aplicaciones en la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. Dicho dispositivo de administración de pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que se ha administrado toda la composición farmacéutica dentro del cartucho y que el cartucho está vacío, el cartucho vacío puede desecharse fácilmente y remplazarse con un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de administración de pluma entonces puede reutilizarse. En un dispositivo de administración de pluma desechable, no hay un cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de administración de pluma desechable viene prellenado con la composición farmacéutica mantenida en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, el dispositivo completo se desecha.

En determinadas situaciones, la composición farmacéutica puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una realización, puede usarse una bomba. En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos; véase, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. En otra realización más, un sistema de liberación controlada puede ubicarse en las proximidades de la diana de la

composición, requiriendo por tanto solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, 1984, en Medical Applications of Controlled Release, anteriormente, vol. 2, págs. 115-138). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer, 1990, Science 249:1527-1533.

- 5 Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones por goteo, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse por métodos conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables pueden prepararse, por ejemplo, disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal, descrita anteriormente, en un medio acuoso estéril o un medio oleoso convencionalmente usado para inyecciones. Como medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo,
- 10 solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que puede usarse en combinación con un agente solubilizante apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (aducto de polioxietileno (50 mol) de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleaginoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal
- 15 como benzoato de bencilo, alcohol bencilico, etc. La inyección así preparada se introduce preferentemente en una ampolla apropiada.

Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas farmacéuticas en una dosis unitaria adecuada para ajustarse a una dosis de los principios activos. Dichas

20 formas farmacéuticas en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc.

Dosificaciones

- 25 La cantidad de la angiopoyetina modificada (por ejemplo, AngF1-Fc-F1) administrada a un sujeto de acuerdo con los métodos de la presente invención es, en general, una cantidad terapéuticamente eficaz. Como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de angiopoyetina modificada que da como resultado uno o más de: (a) una reducción en la gravedad o duración de un síntoma, indicación o complicación de la malaria cerebral grave; (b) aumento de la supervivencia; (c) protección de la integridad de la barrera
- 30 hematoencefálica; y (d) prevención del deterioro neurológico en el sujeto.

En el caso de una angiopoyetina modificada, una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 600 mg, por ejemplo, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 1,0 mg, aproximadamente 1,5 mg, aproximadamente 2,0 mg, aproximadamente 10 mg,

35 aproximadamente 20 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 210 mg,

40 aproximadamente 220 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 410 mg,

45 aproximadamente 420 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 490 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 510 mg, aproximadamente 520 mg, aproximadamente 530 mg, aproximadamente 540 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 560 mg, aproximadamente 570 mg, aproximadamente 580 mg, aproximadamente 590 mg o aproximadamente 600 mg, de la angiopoyetina modificada.

50 La cantidad de angiopoyetina modificada contenida dentro de las dosis individuales se puede expresar en términos de miligramos de proteína por kilogramo de peso corporal del sujeto (es decir, mg/kg). Por ejemplo, la angiopoyetina modificada se puede administrar a un sujeto en una dosis de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del paciente. En determinadas realizaciones, la angiopoyetina modificada se administra a un

55 sujeto que lo necesite a una dosis de aproximadamente 5 - 25 mg/kg del peso corporal del sujeto.

Ejemplos

60 Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se ha intentado garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, la temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está cerca de la atmosférica.

65

Ejemplo 1: Alteraciones en los reguladores endoteliales en el modelo de malaria cerebral experimental (ECM) inducida por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) murino

En este ejemplo, se estudiaron las alteraciones en los reguladores endoteliales en la malaria cerebral experimental inducida por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) en un modelo en ratón. Este modelo se basa en la observación de que los ratones C57Bl/6 son susceptibles al parásito murino *P. berghei* ANKA, que produce una enfermedad grave y finalmente mortal con síntomas neurológicos paralelos a los síntomas y al desarrollo de la enfermedad de la malaria cerebral en seres humanos infectados con *Plasmodium falciparum*. A diferencia de los ratones C57Bl/6, los ratones BALB/c son resistentes a PbA, ya que no desarrollan encefalopatía, aunque resultan infectados y alcanzan niveles similares o, en ocasiones, mayores de densidad de parásitos. Este estudio mostró que la desregulación del eje Ang/Tie2 estaba asociada con la gravedad de la enfermedad y la letalidad. Además, los niveles de Ang1 se correlacionan inversamente con la morbilidad y la mortalidad en el modelo en ratón de malaria cerebral.

Materiales y métodos

Modelo de ECM inducida por PbA: Infección

Se hizo pasar *Plasmodium berghei* ANKA (PbA; MR4, Manassas, VA) crioconservado a través de ratones C57Bl/6 sin tratamiento previo. Para el experimento, la infección se inició en ratones C57Bl/6 y BALB/c mediante inyección intraperitoneal (ip) de 1×10^6 eritrocitos parasitados (PE) recién aislados obtenidos de ratones con pase por donante. La parasitemia se controló mediante frotis de sangre muy líquida teñida con tinción de Geimsa modificada (Protocolo Hema3 Stain Set, Sigma, Oakville, ON) contando al menos 1500 eritrocitos. Los ratones infectados se monitorizaron para determinar la supervivencia, el deterioro neurológico, la fuga vascular, la carga parasitaria y los niveles de factores angiogénicos y marcadores de activación endotelial.

Supervivencia y evaluación del estado de salud

La supervivencia de los ratones tras la infección se representó como curvas de Kaplan Meier usando una prueba del orden logarítmico para la comparación. La evaluación cuantitativa del deterioro neurológico asociado con la ECM (deterioro de la coordinación y el rendimiento motor) se realizó diariamente usando la puntuación rápida de coma y comportamiento murino de 10 parámetros (RMCBS), como se describió anteriormente por Carroll RW, et al. 2010 en PLoS ONE 5: e13124. Los signos de ECM incluyen deterioro del equilibrio/coordinación, deterioro motor (ataxia, hemiplegia/paraplejia), pérdida de reflejos y autoconservación, falta de comportamiento relacionado con la higiene (acicalamiento) y/o crisis epilépticas. Para cada parámetro, se asignó una puntuación de 0 a 2, con 0 indicando la función más baja y una puntuación de 2 la más alta. Las puntuaciones totales para cada ratón se calcularon y se proporcionaron como un porcentaje de la puntuación total posible. Se consideró que los ratones con una puntuación del 35 % o menos tenían ECM grave.

Ensayo de permeabilidad al azul de Evans

La permeabilidad vascular en el cerebro se evaluó usando el colorante azul de Evans (EB). A los ratones se les inyectaron por vía intravenosa a través de la vena de la cola 0,1 ml de solución de colorante azul de Evans al 1 % (azul de Evans en polvo; Sigma-Aldrich en PBS, filtro esterilizado) cuando se observaron signos clínicos de ECM. Los ratones se sacrificaron con isoflurano (anestésico por inhalación al 99,9 %) después de 1 hora, se perfundieron con 50 ml de PBS (1X). Los cerebros se diseccionaron asépticamente, se pesaron, se fotografiaron y se colocaron en 1 ml de N,N-dimetilformamida durante 48 horas a temperatura ambiente para extraer el colorante del tejido. La absorbancia se midió a 620 nm. La concentración se calculó usando una curva patrón de colorante EB y se expresó como ng de colorante por gramo de tejido cerebral.

Detección de marcadores de citocinas de activación endotelial

Se extrajo sangre periférica completa mediante venopunción safena el día 0 (d 0; antes de la infección por PbA) y el día 6 tras la infección en tubos heparinizados (Starstedt). Se aisló plasma de muestras de sangre completa mediante centrifugación a $1000 \times g$ durante 15 min. Las muestras de plasma se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Los niveles de molécula de adhesión intercelular de ratón-1 (sICAM-1/CD54), E-Selectina (sE-Select/CD62E) y molécula de adhesión de células vasculares-1 (sVCAM-1/CD106) en sus formas solubles se determinaron en plasma usando kits de ELISA murinos disponibles en el mercado (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de antígeno del factor de von Willebrand (vWF:Ag) se midieron en suero mediante ELISA de la siguiente manera: se recubrieron las placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc) durante la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-vWF humano (1:600, Dako, Glostrup, Dinamarca) en PBS 0,01 M. Se sembró suero de ratón en BSA-PBS al 1 % y el vWF:Ag unido se detectó con anticuerpo policlonal anti-vWF humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (1:8000, Dako). Las placas se desarrollaron con una solución sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se leyó la absorbancia a 450 nm, después de que la reacción colorimétrica se detuviera con H_2SO_4 . La concentración de vWF:Ag se interpoló a partir de una curva patrón creada con vWF humano de una concentración conocida a partir de plasma congelado fresco (1:500, American Diagnostica, Stamford, CT) que se incluyó en cada placa. Se determinaron IFN-gamma y TNF-alfa en plasma

usando kits de ELISA murinos disponibles en el mercado (eBioscience), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Análisis estadístico

- 5 El análisis estadístico se realizó usando GraphPad Prism versión 4.00 (San Diego, CA). La supervivencia de ratones tras la infección se representó gráficamente como curvas de Kaplan Meier y se evaluó mediante la prueba del orden logarítmico. Los estudios de supervivencia se realizaron por triplicado y los datos se agruparon a menos que se especifique lo contrario. La prueba de Shapiro-Wilk se usó para determinar los datos distribuidos normalmente y las comparaciones entre los grupos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney o la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba post-hoc de Dunn. Se usó ANOVA bidireccional para comparar entre grupos en 10 múltiples puntos temporales. Para ensayar biomarcadores de plasma, se usó la prueba de Friedman con la comparación múltiple de Dunn para comparar los niveles entre las muestras recogidas de pacientes en diferentes puntos temporales (por ejemplo, ingreso y convalecencia). Todos los datos se presentan como mediana y RIC (no paramétrico), a menos que se indique otra cosa. Los datos normalmente distribuidos se presentan como media y SEM. Un $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos de múltiples experimentos se normalizaron a la media geométrica del grupo infectado pero no tratado de cada experimento para comparaciones.

Resultados

- 20 Como se muestra en la figura 1, los ratones BALB/c resistentes (también denominados "ECM-R") mostraron una supervivencia significativamente prolongada ($p=0,0007$, prueba del orden logarítmico) después de la infección con PbA en comparación con los ratones C57Bl/6 susceptibles (también denominados "ECM-S"). Los ratones BALB/c resistentes mostraron una supervivencia del 100 % durante los 7 días tras la infección, y la supervivencia disminuyó a más del 10 % en el día 10 y hasta el día 14 (cuando los ratones fueron sacrificados). Por el contrario, los ratones 25 C57Bl/6 susceptibles mostraron solo aproximadamente un 50 % de supervivencia ya el día 6 con un 0 % el día 8 tras la infección.

- Los ratones ECM-S mostraron deterioro neurológico, como lo evidencian las puntuaciones de menos del 35 % aproximadamente el día 6 en comparación con los ratones resistentes a ECM-R que mostraron una ausencia de 30 deterioro neurológico (figura 2). Se usó la extravasación de azul de Evans (EB) para evaluar la permeabilidad vascular y la disfunción de la barrera hematoencefálica. Después de la perfusión para eliminar el colorante circulante, el nivel de EB extravasado en parénquima cerebral de ratones ECM-S infectados con PbA fue 2 veces más alto que el nivel en ratones ECM-R con cargas parasitarias comparables [media (SD) de colorante EB/g de tejido: 10,7 (7,9) para ratones ECM-R frente a 22,9 (7,2) para ratones ECM-S; $p=0,005$], coherente con un aumento 35 de la fuga vascular y la pérdida de la integridad de la barrera hematoencefálica (figura 3). Esto fue independiente de la parasitemia observada, como lo demuestra una mayor carga parasitaria en los ratones resistentes en comparación con los ratones susceptibles (figura 4).

- Los ratones ECM-R difirieron de los ratones ECM-S en los niveles de factores angiogénicos Ang1, Ang2 y vWF en la 40 infección por PbA. La evaluación longitudinal en el transcurso de la infección mostró que los niveles de Ang1 disminuían con el tiempo ($p < 0,0001$, ANOVA bidireccional; figura 5). La cinética de la disminución de Ang1 tras la infección fue significativamente diferente en ratones ECM-R frente a ECM-S ($p=0,02$, ANOVA bidireccional). Durante la fase aguda de la enfermedad, los ratones ECM-R mantuvieron niveles de Ang1 significativamente más altos en comparación con los ratones ECM-S ($p < 0,001$). Para ambas cepas, la pérdida de Ang1 circulante se asoció con la 45 aparición de deterioro neurológico y ECM, según lo determinado por una disminución significativa en la RMCBS. Los niveles séricos de Ang1 (ng/ml) se correlacionaron significativamente con las puntuaciones de RMCBS (%) ($p < 0,05$; figura 6a) y con el tiempo hasta la muerte (horas) ($p < 0,0001$; figura 6b). En general, cuando se evaluó el día 6 tras la infección, los ratones con los niveles más bajos de Ang1 circulante tuvieron una probabilidad significativamente mayor de avanzar hasta un desenlace fatal, lo que respalda la hipótesis de que Ang1 puede ser un determinante 50 crítico de la supervivencia.

Los ratones ECM-R mostraron niveles de Ang2 y vWF significativamente más bajos (figuras 7 - 9).

Ejemplo 2: El bloqueo de Ang2 no confiere una protección mejorada contra el desarrollo de CM experimental

- 55 En este ejemplo, se evaluó el efecto del bloqueo de Ang2 en ECM inducida por PbA en un modelo en ratón. Veinte ratones C57Bl/6 fueron infectados por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) a través de una inyección intraperitoneal de 1×10^6 eritrocitos parasitados (PE) recién aislados obtenidos de ratones con pase por donante el día 0. Los ratones infectados se trataron con 15 mg/kg de un anticuerpo anti-Ang2, H1H685, como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos No. US20110027286, los días -1, 1, 4 y 7 tras la infección mediante inyección 60 subcutánea. Los ratones se monitorizaron para determinar la supervivencia, el deterioro neurológico, la carga parasitaria y los niveles de proteínas plasmáticas, como se describe en detalle en el ejemplo 1.

- La figura 10 muestra una curva de Kaplan Meier que representa gráficamente la supervivencia de ratones infectados 65 con PbA y tratados con anticuerpo anti-Ang2 (denominado "mAb 'B'" en la figura 10), o un control de isotipo (mAb 'A') o solución salina. El bloqueo de Ang2 con el anticuerpo anti-Ang2 no causó un aumento de la supervivencia de los

ratones infectados en comparación con el control de isotipo. El tratamiento con anticuerpo anti-Ang2 tampoco evitó el deterioro neurológico en los ratones infectados (figura 11), aunque no hubo una diferencia significativa en la carga parasitaria entre los ratones infectados tratados con anticuerpo anti-Ang2, el control de isotipo o solución salina (figura 12). Los niveles de proteína plasmática de vWF, ICAM, VCAM y E-selectina no difirieron significativamente en los ratones tratados con el anticuerpo anti-Ang2 o control de isotipo (figura 13).

Ejemplo 3: La administración terapéutica de Ang1 mejora significativamente la supervivencia de ratones infectados con PbA

En este ejemplo, se estudió el efecto de la administración de Ang1 sobre la ECM inducida por PbA en un modelo en ratón. Ochenta ratones C57Bl/6 fueron infectados por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) a través de una inyección intraperitoneal de 1×10^6 eritrocitos parasitados (PE) recién aislados obtenidos de ratones con pase por donante el día 0. Los ratones infectados se dividieron en cuatro grupos y se trataron con ya sea 15 mg/kg de un anticuerpo anti-Ang2 (véase el ejemplo 2), un anticuerpo de bloqueo doble "comparador" de Ang1/Ang2 o un control de isotipo, o con 25 mg/kg de AngF1-Fc-F1 (SEQ ID NO: 2) a través de inyección subcutánea el día 4 y el día 6 tras la infección. El anticuerpo de bloqueo de Ang1/Ang2 doble "comparador" fue el pepticuerpo 2xCon4C (AMG386) como se expone en la Patente de Estados Unidos No. 7205275 (Amgen). Los ratones se monitorizaron para determinar la supervivencia, el deterioro neurológico, la carga parasitaria y los niveles de proteínas plasmáticas, como se describe en detalle en el ejemplo 1.

Como se muestra en la figura 14, la administración terapéutica de AngF1-Fc-F1 a ratones infectados con PbA mejoró significativamente la supervivencia ($p < 0,05$, prueba del orden logarítmico) en comparación con ratones tratados con el control de isotipo, el anticuerpo anti-Ang2 o el anticuerpo de bloqueo doble. Los ratones tratados con AngF1-Fc-F1 mostraron una supervivencia de más del 35 % hasta al menos el día 15 tras la infección en comparación con los ratones tratados con los otros tres tratamientos que mostraron una supervivencia del 0% el día 8 tras la infección, aunque el porcentaje de parasitemia en todos los tratamientos fue similar (figura 15). El tratamiento con AngF1-Fc-F1 también protegió la integridad de la barrera hematoencefálica como lo muestra la captación de colorante azul de Evans (figura 16). Los ratones tratados con AngF1-Fc-F1 mostraron una cantidad significativamente baja de captación de colorante (panel C de la figura 16a), coherente con el mantenimiento de una barrera hematoencefálica intacta y una permeabilidad vascular reducida ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis), a pesar de que el porcentaje de parasitemia fue similar (figura 16b). Esto confirmó que la Ang1 exógena es suficiente para mantener la integridad de la barrera hematoencefálica después de una exposición letal a malaria.

La administración terapéutica de AngF1-Fc-F1 también evitó la morbilidad y el deterioro neurológico asociados con la ECM (figura 17), independientemente de los cambios en la parasitemia periférica (figura 18). El día 6 tras la infección, la mayoría de los ratones de control habían progresado a ECM, mientras que la progresión de la enfermedad se mitigó en los ratones tratados. Los ratones tratados con AngF1-Fc-F1 infectados mostraron una pérdida de peso similar a los ratones tratados con control.

Para determinar si la protección vascular con AngF1-Fc-F1 se produjo secundariamente a una reducción de las citocinas inflamatorias o si la protección se debió a un aumento directo de la estabilidad vascular frente a una respuesta inflamatoria sistémica, muestras de plasma de ratones infectados con PbA tratados y no tratados fueron analizadas para citocinas proinflamatorias clave. Los ratones infectados con PbA mostraron un aumento significativo de TNF e IFN γ el día 6 tras la infección (aumento de 3 veces en TNF y un aumento de 60 veces en IFN γ en comparación con el valor inicial, $p < 0,01$ para ambos, ANOVA unidireccional) a pesar del tratamiento. El tratamiento con AngF1-Fc-F1 no afectó a los niveles de TNF o IFN γ , y tanto los ratones de control como los tratados mostraron una regulación positiva similar en respuesta a la infección (figura 19a).

La estimulación con citocinas proinflamatorias y/o las interacciones endoteliales directas con eritrocitos parasitados pueden contribuir a una serie de eventos patológicos implicados en la CM, incluyendo la regulación positiva de los receptores de células endoteliales que median la citoadhesión del parásito. La interrupción del secuestro del parásito a los receptores del huésped a través de la regulación negativa de las moléculas de adhesión celular (CAM), tales como ICAM-1 y/o la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), puede disminuir la obstrucción microvascular y la disfunción endotelial. Por lo tanto, se investigó el efecto del tratamiento con Ang1 sobre la reducción de los niveles circulantes de formas solubles de CAMS, considerado como un indicador de la activación endotelial y un fenotipo vascular proadhesivo. El análisis de las muestras de plasma recogidas el día 6 tras la infección mostró un aumento de 4 veces en los niveles circulantes de sICAM-1 con infección por PbA, en comparación con el valor inicial ($p < 0,001$, ANOVA unidireccional con prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples; figura 19c). Estos niveles se redujeron significativamente con el tratamiento con Ang1 en comparación con los controles infectados con PbA ($p < 0,05$; figura 19c). De forma similar, los niveles de sVCAM-1 aumentaron significativamente el día 6 después de la infección con PbA (aumento de 5 veces, $p < 0,001$; figura 19c) y el tratamiento con Ang1 redujo significativamente los niveles circulantes de sVCAM-1 en comparación con los controles infectados con PbA ($p < 0,05$, figura 19c). Estos datos indican que las interacciones Ang-1-Tie-2 ayudan a mantener la inactividad vascular frente a la respuesta inflamatoria sistémica, en parte a través de la preservación de un fenotipo vascular antiadhesivo a través de la regulación negativa de las moléculas de adhesión.

Este estudio demostró que la administración terapéutica de Ang1 (AngF1-Fc-F1), pero no la inhibición de Ang2, mejoró la integridad de la barrera hematoencefálica y la supervivencia. Esto respaldó la investigación de pro-Ang1, pero no la inhibición de Ang2 como terapia complementaria para la malaria cerebral. Además, es de interés que el tratamiento basado en Ang1 fue eficaz y preservó la integridad de la barrera hematoencefálica, a pesar de una respuesta sistémica proinflamatoria robusta a la infección. Los datos sugieren que las estrategias antiinflamatorias pueden no ser necesarias para preservar la integridad vascular y mejorar el desenlace en infecciones potencialmente mortales asociadas con inflamación sistémica.

En un experimento adicional, AngF1-Fc-F1 se administrará en combinación con un anticuerpo anti-Tie2 (como se expone en el documento US20130209492) a ratones C57Bl/6 susceptibles infectados para estudiar la implicación de Tie2 en el bloqueo del efecto protector de AngF1-Fc-F1. El anticuerpo anti-Tie2 puede ser un anticuerpo activador (o agonista), por ejemplo, aumenta la unión de una angiopoyetina y/o aumenta la actividad de Tie2. Se espera que el AngF1-Fc-F1 administrado en combinación con el anticuerpo anti-Tie2 conduzca a una menor supervivencia de los ratones infectados en comparación con el AngF1-Fc-F1 solo.

En otro experimento adicional, AngF1-Fc-F1 se usará para tratar ratones BALB/c resistentes infectados con PbA para estudiar el efecto sobre la supervivencia, la integridad de la barrera hematoencefálica, el deterioro neurológico y los marcadores de proteínas plasmáticas. Se espera que la administración de AngF1-Fc-F1 conduzca a una mejor protección de la integridad de la barrera hematoencefálica y la supervivencia de ratones BALB/c infectados.

En un tercer experimento, se administrará AngF1-Fc-F1 en combinación con un anticuerpo anti-Tie2 a ratones BALB/c resistentes infectados para estudiar si los ratones resistentes se vuelven susceptibles a ECM. Se espera que el AngF1-Fc-F1 administrado en combinación con el anticuerpo anti-Tie2 conduzca a una menor supervivencia de los ratones BALB/c infectados en comparación con el AngF1-Fc-F1 solo.

Ejemplo 4: Administración terapéutica de AngF1-Fc-F1 como terapia complementaria en combinación con artesunato

En este ejemplo, se estudió el efecto de la administración de AngF1-Fc-F1 en combinación con artesunato sobre ECM inducida por PbA en un modelo en ratón. Veinte ratones C57Bl/6 fueron infectados por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) a través de una inyección intraperitoneal de 1×10^6 eritrocitos parasitados (PE) recién aislados obtenidos de ratones con pase por donante el día 0. Los ratones infectados se trataron con 15 mg/kg de AngF1-Fc-F1 (SEQ ID NO: 2) los días 4 y 6 tras la infección y con 10 mg/kg de artesunato el día 5 tras la infección mediante inyección subcutánea. Los ratones se monitorizaron para determinar la supervivencia, el deterioro neurológico, la carga parasitaria y los niveles de proteínas plasmáticas, como se describe en detalle en el ejemplo 1.

El tratamiento complementario con AngF1-Fc-F1 mejoró significativamente la supervivencia de los ratones infectados en comparación con el artesunato solo (figura 20). Los ratones infectados tratados con AngF1-Fc-F1 en combinación con artesunato mostraron un 100 % de supervivencia al menos hasta el día 15 tras la infección. Por el contrario, los ratones infectados tratados con artesunato solo mostraron una supervivencia inferior al 60 % el día 8 tras la infección. A pesar de la disminución significativa de la carga parasitaria a los niveles previos a la ECM (es decir, <2 % de parasitemia), el 41,7 % de los ratones tratados con artesunato murieron de ECM. Este efecto fue independiente del porcentaje de parasitemia (figura 21).

En un experimento adicional, se estudiará el efecto de AngF1-Fc-F1 complementario en combinación con artesunato sobre el deterioro neurológico en ratones infectados. Se espera que la administración de AngF1-Fc-F1 en combinación con artesunato prevenga el deterioro neurológico en ratones infectados en comparación con el artesunato solo.

En otro experimento adicional, se administrará AngF1-Fc-F1 en combinación con un anticuerpo anti-Ang2 (como se describe en el ejemplo 2) para estudiar la supervivencia de ratones infectados. Se espera que el AngF1-Fc-F1 administrado en combinación con el anticuerpo anti-Ang2 conduzca a una supervivencia mejorada de los ratones infectados en comparación con el AngF1-Fc-F1 solo.

Ejemplo 5: Protección contra lesión pulmonar aguda asociada a malaria

En este ejemplo, se estudiará el efecto de la administración de AngF1-Fc-F1 sobre la permeabilidad vascular en el pulmón y la lesión pulmonar aguda asociada a malaria en ratones infectados. Veinte ratones C57Bl/6 se infectarán con *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) a través de una inyección intraperitoneal de 1×10^6 eritrocitos parasitados (PE) recién aislados obtenidos de ratones con pase por donante el día 0. Los ratones infectados se tratarán con 15 mg/kg de AngF1-Fc-F1 (SEQ ID NO: 2) los días 4 y 6 tras la infección a través de inyección subcutánea. Los ratones se monitorizarán para determinar la supervivencia y la permeabilidad vascular en los pulmones mediante tinción con azul de Evans.

Se espera que los ratones tratados con AngF1-Fc-F1 muestren ausencia de captación de colorante azul de Evans en los pulmones, lo que indica ausencia de permeabilidad vascular y protección contra lesión pulmonar aguda

asociada a malaria.

El alcance de la presente invención no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en el presente documento. De hecho, a partir de la descripción anterior y de las figuras adjuntas, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán obvias para los expertos en la materia. Se pretende incluir dichas modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- | | |
|----|--|
| 10 | <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
University Health Network, Toronto, Canadá
Lisa A. Purcell Ngambo
Sarah J. Higgins
Kevin C. Kain |
| 15 | <120> INTERVENCIONES BASADAS EN ANGIOPOYETINA PARA
EL TRATAMIENTO DE LA MALARIA CEREBRAL |
| 20 | <130> A0007-WO

<160> 4

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0 |
| 25 | <210> 1
<211> 1977
<212> ADN
<213> Secuencia artificial |
| 30 | <220>
<223> sintético

<400> 1 |

ES 2 727 532 T3

```

ttcagagact ggcgcgacgt gtaccaggcc ggcttcaaca agtccggcat ctacaccatc 60
tacatcaaca acatgcctga gcctaagaag gtgttctgca acatggacgt gaacggcggc 120
ggctggacag tgatccagca cagagaggac ggctccctgg acttccagag aggctggaag 180
gagtacaaga tgggcttcgg caacccttcc ggcgagtact ggctgggcaa cgagttcatc 240
ttcgccatca cctcccagag acagtacatg ctgagaatcg agctgatgga ctgggagggc 300
aacagagcct actcccagta cgacagattc cacatcggca acgagaagca gaactacaga 360
ctgtacctga agggccacac cggcaccgcc ggcaagcagt cctccctgat cctccacggc 420
gccgacttct ccaccaagga cgccgacaac gacaactgca tgtgcaagtg cgccctgatg 480
ctgaccggcg gctgggtggt cgacgcctgc ggcccttcca acctgaacgg catgttctac 540
accgccggcc agaaccacgg caagtgaac ggcatcaagt ggcactactt caaaggccct 600
tcctactccc tgaggtcgac caccatgatg atcagacctc tggacttcga caaaactcac 660
acatgcccc cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 720
ccaaaaccca aggaaccctt catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg 780
gacgtgagcc acgaagacccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 840
cataatgcca agacaaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 900
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 960
aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1020
gaaccacagg tgtaaccctt gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1080
ctgacctgcc tggtaaaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200
ttcctctata gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1260
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1320
ccgggtttta gagactgcgc agatgtatat caagctggtt ttaataaaaag tggaatctac 1380
actatttata ttaataatat gccagaaccc aaaaagggtg tttgcaatat ggatgtcaat 1440
gggggaggtt ggactgtaat acaacatcgt gaagatggaa gtctagattt ccaaagaggc 1500
tggaaggaat ataaaaatggg ttttggaat ccctccggtg aatattggct ggggaatgag 1560
tttatTTTTT ccattaccag tcagaggcag tacatgctaa gaattgagtt aatggactgg 1620
gaagggaacc gagcctattc acagtatgac agattccaca taggaaatga aaagcaaaac 1680
tataggttgt atttaaaaag tcacactggg acagcaggaa aacagagcag cctgatctta 1740
cacggtgctg atttcagcac taaagatgct gataatgaca actgtatgtg caaatgtgcc 1800
ctcatgttaa caggaggatg gtggtttgat gcttgtggcc cctccaatct aaatggaatg 1860
ttctatactg cgggacaaaa ccatggaaaa ctgaatggga taaagtggca ctacttcaaa 1920

```

gggccaagtt actccttacg ttccacaact atgatgattc gacctttaga tttttaa 1977

5 <210> 2
<211> 658
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> sintético

<400> 2

ES 2 727 532 T3

Phe	Arg	Asp	Cys	Ala	Asp	Val	Tyr	Gln	Ala	Gly	Phe	Asn	Lys	Ser	Gly
1				5					10					15	
Ile	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Ile	Asn	Asn	Met	Pro	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Phe
			20					25					30		
Cys	Asn	Met	Asp	Val	Asn	Gly	Gly	Gly	Trp	Thr	Val	Ile	Gln	His	Arg
		35					40					45			
Glu	Asp	Gly	Ser	Leu	Asp	Phe	Gln	Arg	Gly	Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Met
	50					55					60				
Gly	Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Glu	Phe	Ile
65					70					75					80
Phe	Ala	Ile	Thr	Ser	Gln	Arg	Gln	Tyr	Met	Leu	Arg	Ile	Glu	Leu	Met
				85					90					95	
Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Arg	Ala	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Asp	Arg	Phe	His	Ile
			100					105					110		
Gly	Asn	Glu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Arg	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	His	Thr	Gly
		115					120					125			
Thr	Ala	Gly	Lys	Gln	Ser	Ser	Leu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Asp	Phe	Ser
	130					135					140				
Thr	Lys	Asp	Ala	Asp	Asn	Asp	Asn	Cys	Met	Cys	Lys	Cys	Ala	Leu	Met
145					150					155					160
Leu	Thr	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Asp	Ala	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn
				165					170					175	
Gly	Met	Phe	Tyr	Thr	Ala	Gly	Gln	Asn	His	Gly	Lys	Leu	Asn	Gly	Ile
			180					185					190		
Lys	Trp	His	Tyr	Phe	Lys	Gly	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr
		195					200					205			
Met	Met	Ile	Arg	Pro	Leu	Asp	Phe	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
	210					215					220				
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
225					230					235					240
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245					250					255	
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
			260					265					270		
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
		275					280						285		
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
	290					295					300				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
305					310					315					320
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
				325					330					335	
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
			340					345					350		
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
		355					360					365			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
	370					375					380				

Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
385					390					395					400
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
				405					410					415	
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
			420				425						430		
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Phe	Arg	Asp	Cys	Ala	Asp
		435					440					445			
Val	Tyr	Gln	Ala	Gly	Phe	Asn	Lys	Ser	Gly	Ile	Tyr	Thr	Ile	Tyr	Ile
	450					455					460				
Asn	Asn	Met	Pro	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Phe	Cys	Asn	Met	Asp	Val	Asn
465					470					475					480
Gly	Gly	Gly	Trp	Thr	Val	Ile	Gln	His	Arg	Glu	Asp	Gly	Ser	Leu	Asp
				485					490					495	
Phe	Gln	Arg	Gly	Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Met	Gly	Phe	Gly	Asn	Pro	Ser
			500					505					510		
Gly	Glu	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Glu	Phe	Ile	Phe	Ala	Ile	Thr	Ser	Gln
		515					520					525			
Arg	Gln	Tyr	Met	Leu	Arg	Ile	Glu	Leu	Met	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Arg
		530				535					540				
Ala	Tyr	Ser	Gln	Tyr	Asp	Arg	Phe	His	Ile	Gly	Asn	Glu	Lys	Gln	Asn
545					550					555					560
Tyr	Arg	Leu	Tyr	Leu	Lys	Gly	His	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Gln	Ser
				565					570					575	
Ser	Leu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Asp	Asn
			580					585					590		
Asp	Asn	Cys	Met	Cys	Lys	Cys	Ala	Leu	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Trp	Trp
		595					600					605			
Phe	Asp	Ala	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met	Phe	Tyr	Thr	Ala
	610						615				620				
Gly	Gln	Asn	His	Gly	Lys	Leu	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp	His	Tyr	Phe	Lys
625					630					635					640
Gly	Pro	Ser	Tyr	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Pro	Leu
				645					650					655	
Asp	Phe														

<210> 3
 <211> 2025
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> sintético

<400> 3

```

agagactgtg ctgaagtatt caaatcagga cacaccacaa atggcatcta cacgttaaca 60
ttccctaatt ctacagaaga gatcaaggcc tactgtgaca tggaagctgg aggaggcggg 120
tggaacaatta ttcagcgacg tgaggatggc agcgttgatt ttcagaggac ttggaaagaa 180
tataaagtgg gatttggtta cccttcagga gaatattggc tgggaaatga gtttgtttcg 240
caactgacta atcagcaacg ctatgtgctt aaaatacacc ttaaagactg ggaagggaaat 300
gaggettaact cattgtatga acatttctat ctctcaagtg aagaactcaa ttataggatt 360
caccttaaag gacttacagg gacagccggc aaaataagca gcatcagcca accaggaaat 420
gatttttagca caaaggatgg agacaacgac aaatgtattt gcaaagtgtc acaaatgcta 480
acaggaggct ggtgggttga tgcattgtgt ccttccaact tgaacggaat gtactatcca 540
cagaggcgaga acacaaataa gttcaacggc attaaatggt actactggaa aggcctcaggc 600
tattcgctca aggccacaac catgatgatc cgaccagcag atttcggggg cccgggcgag 660
cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccacgtgcc cagcacctga actcctgggg 720

```

```

ggaccgtcag tcttctctct ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 900
aacagcaagt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccc atcccgggat 1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaaggcgggt gcggttctgg cgcgcctaga 1380
gactgtgctg aagtattcaa atcaggacac accacaaatg gcatctacac gttaacattc 1440
cctaattota cagaagagat caaggcctac tgtgacatgg aagctggagg aggcgggtg 1500
acaattatc agcgacgtga ggatggcagc gttgatttct agaggacttg gaaagaatat 1560
aaagtgggat ttggttaacc ttcaggagaa tattggctgg gaaatgagtt tgtttcgcaa 1620
ctgactaatc agcaacgcta tgtgcttaaa atacacctta aagactggga agggaatgag 1680
gcttactcat tgtatgaaca tttctatctc tcaagtgaag aactcaatta taggattcac 1740
cttaaaggac ttacagggac agccggcaaa ataagcagca tcagccaacc aggaaatgat 1800
tttagcacia aggatggaga caacgacaaa tgtatttgca aatgttcaca aatgctaaca 1860
ggaggctggt ggtttgatgc atgtggtcct tccaacttga acggaatgta ctatccacag 1920
aggcagaaca caaataagtt caacggcatt aaatggtact actggaaagg ctcaggctat 1980
tcgctcaagg ccacaaccat gatgatccga ccagcagatt tctga 2025

```

5 <210> 4
 <211> 674
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintético
 <400> 4

ES 2 727 532 T3

Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Val	Phe	Lys	Ser	Gly	His	Thr	Thr	Asn	Gly	Ile
1				5					10					15	
Tyr	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	Asn	Ser	Thr	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Tyr	Cys
			20					25					30		
Asp	Met	Glu	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp	Thr	Ile	Ile	Gln	Arg	Arg	Glu
		35					40					45			
Asp	Gly	Ser	Val	Asp	Phe	Gln	Arg	Thr	Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Val	Gly
	50					55					60				
Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp	Leu	Gly	Asn	Glu	Phe	Val	Ser
65					70					75					80
Gln	Leu	Thr	Asn	Gln	Gln	Arg	Tyr	Val	Leu	Lys	Ile	His	Leu	Lys	Asp
				85					90					95	
Trp	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Glu	His	Phe	Tyr	Leu	Ser
			100					105					110		
Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Tyr	Arg	Ile	His	Leu	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr
		115					120					125			
Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ser	Ile	Ser	Gln	Pro	Gly	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr
	130					135					140				
Lys	Asp	Gly	Asp	Asn	Asp	Lys	Cys	Ile	Cys	Lys	Cys	Ser	Gln	Met	Leu
145					150					155					160
Thr	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Asp	Ala	Cys	Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly
			165						170					175	
Met	Tyr	Tyr	Pro	Gln	Arg	Gln	Asn	Thr	Asn	Lys	Phe	Asn	Gly	Ile	Lys
			180					185					190		
Trp	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ala	Thr	Thr	Met
		195					200					205			
Met	Ile	Arg	Pro	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Pro	Gly	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys

ES 2 727 532 T3

210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
225	230	235
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		240
	245	250
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		255
	260	265
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		270
	275	280
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		285
	290	295
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		300
305	310	315
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		320
	325	330
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		335
	340	345
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		350
	355	360
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		365
	370	375
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		380
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		400
	405	410
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		415
	420	425
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		430
	435	440
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Arg Asp Cys Ala Glu		445
	450	455
Val Phe Lys Ser Gly His Thr Thr Asn Gly Ile Tyr Thr Leu Thr Phe		460
465	470	475
Pro Asn Ser Thr Glu Ile Lys Ala Tyr Cys Asp Met Glu Ala Gly		480
	485	490
Gly Gly Gly Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp		495
	500	505
Phe Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys Val Gly Phe Gly Asn Pro Ser		510
	515	520
Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln		525
	530	535
Gln Arg Tyr Val Leu Lys Ile His Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu		540
545	550	555
Ala Tyr Ser Leu Tyr Glu His Phe Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn		560
	565	570
Tyr Arg Ile His Leu Lys Gly Leu Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser		575
	580	585
Ser Ile Ser Gln Pro Gly Asn Asp Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn		590
	595	600
Asp Lys Cys Ile Cys Lys Cys Ser Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp		605
	610	615
Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln		620
625	630	635
Arg Gln Asn Thr Asn Lys Phe Asn Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys		640
	645	650
Gly Ser Gly Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala		655
	660	665
Asp Phe		670

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína angiopoyetina modificada para su uso en un método de tratamiento, prevención o mejora de al menos un síntoma, indicación o complicación de la malaria cerebral, comprendiendo dicho método administrar la composición a un sujeto que lo necesite, en la que la angiopoyetina modificada comprende una proteína de fusión que comprende al menos un dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina-1 fusionado a un fragmento Fc de inmunoglobulina.
2. La composición para su uso en el método de la reivindicación 1, en la que el al menos un síntoma, indicación o complicación se selecciona del grupo que consiste en fiebre, cefalea y mialgia seguidos de somnolencia, confusión, fuga vascular, pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica, nivel sanguíneo elevado de un marcador endotelial, seleccionado opcionalmente del grupo que consiste en Ang1, Ang2, Tie2, vWF, ICAM-1, E-selectina y VCAM-1, secuestro de eritrocitos parasitados en el cerebro, deterioro del equilibrio o la coordinación, deterioro motor, esplenomegalia, pérdida de reflejos y autoconservación, falta de comportamiento relacionado con la higiene, lesión pulmonar aguda, convulsiones, crisis epilépticas, coma y muerte.
3. La composición para su uso en el método de la reivindicación 1 o 2, en la que:
 - (a) la angiopoyetina modificada se administra a una dosis de 5 a 50 mg/kg del peso corporal del sujeto, opcionalmente en la que la angiopoyetina modificada se administra como una dosis de 15 mg/kg del peso corporal del sujeto; y/o
 - (b) la angiopoyetina modificada se administra por vía subcutánea; y/o
 - (c) la angiopoyetina modificada se administra en combinación con un segundo agente terapéutico; y/o
 - (d) la angiopoyetina modificada se administra en combinación con un segundo agente terapéutico y el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en una artemisinina, quinina y una variante o derivado de la mismas, opcionalmente en la que el segundo agente terapéutico es artesunato
4. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la administración de la angiopoyetina modificada aumenta la supervivencia.
5. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la administración de la angiopoyetina modificada protege la integridad de la barrera hematoencefálica.
6. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína angiopoyetina modificada para su uso en un método de prevención de la malaria cerebral grave en un sujeto infectado con *Plasmodium* spp., comprendiendo el método: (a) seleccionar un sujeto con más del 0,1 % de parasitemia; y (b) administrar la composición farmacéutica al sujeto que lo necesite, en la que la angiopoyetina modificada comprende una proteína de fusión que comprende al menos un dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina-1 fusionado a un fragmento Fc de inmunoglobulina.
7. La composición para su uso en el método de la reivindicación 6, en la que la administración de la angiopoyetina modificada previene al menos una indicación seleccionada del grupo que consiste en deterioro neurológico y fuga vascular, opcionalmente en la que al menos una indicación de deterioro neurológico se selecciona del grupo que consiste en deterioro del equilibrio o la coordinación, deterioro motor, pérdida de reflejos y autoconservación, lesión y deterioro neurocognitivos a largo plazo, deficiencia de memoria, trastornos afectivos, falta de comportamiento relacionado con la higiene, convulsiones y crisis epilépticas.
8. La composición para su uso en el método de la reivindicación 6 o 7, en la que la administración de la angiopoyetina modificada previene la pérdida de integridad de la barrera hematoencefálica.
9. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en la que:
 - (a) la angiopoyetina modificada se administra a una dosis de 15 mg/kg del peso corporal del sujeto; y/o
 - (b) la angiopoyetina modificada se administra por vía subcutánea; y/o
 - (c) la angiopoyetina modificada se administra en combinación con un segundo agente terapéutico, opcionalmente en la que el segundo agente terapéutico es artesunato.
10. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en la que la proteína de fusión comprende un primer dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina-1 fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un fragmento Fc y el fragmento Fc fusionado en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de un segundo dominio similar a fibrinógeno de angiopoyetina-1.
11. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, en la que la angiopoyetina-1 modificada es AngF1-Fc-F1.
12. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que el fragmento

Fc comprende un dominio Fc de IgG.

13. La composición para su uso en el método de la reivindicación 12, en el que el dominio Fc de IgG es un dominio Fc de IgG1 humana.

5 14. La composición para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, en la que la angiopoyetina-1 modificada consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

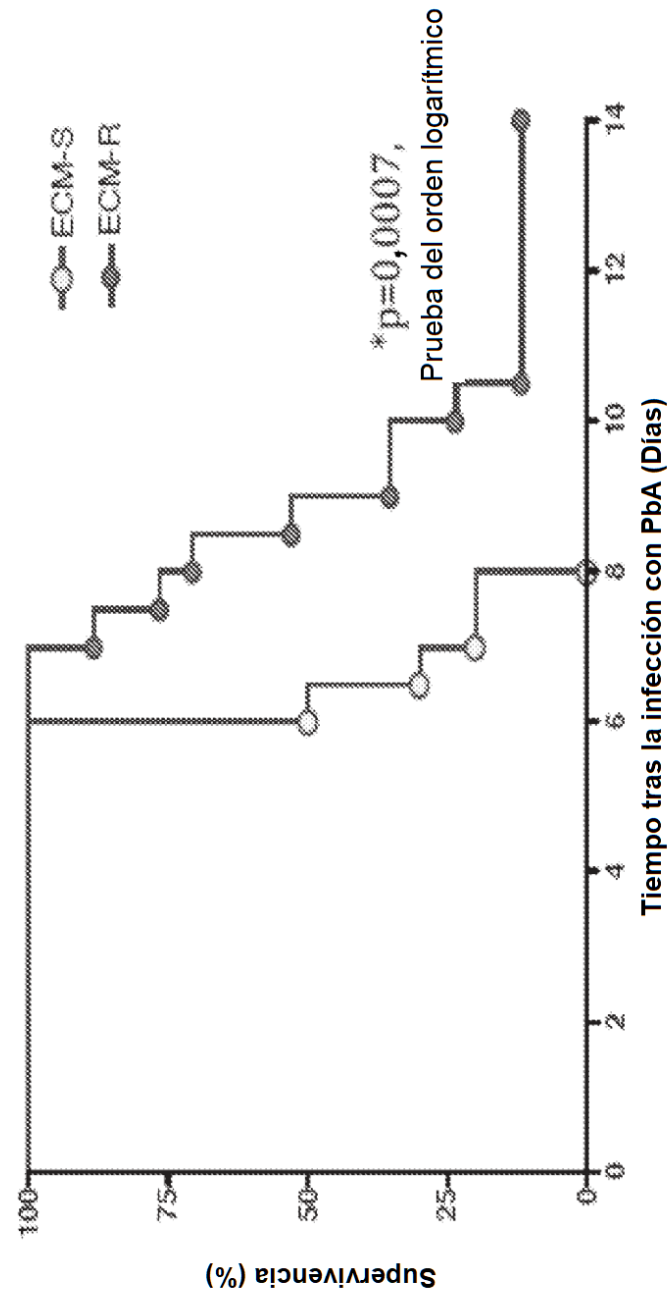


Figura 1

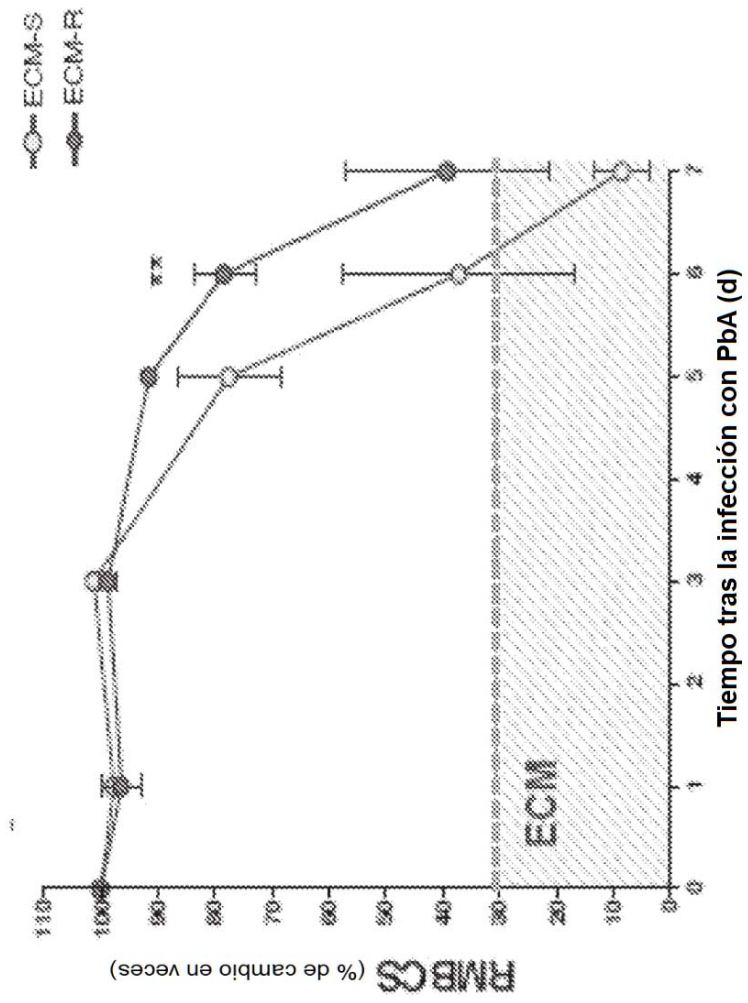


Figura 2

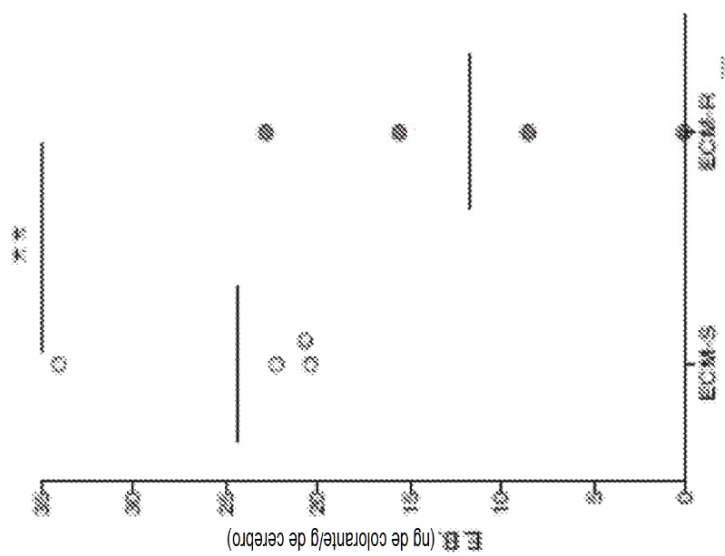


Figura 3

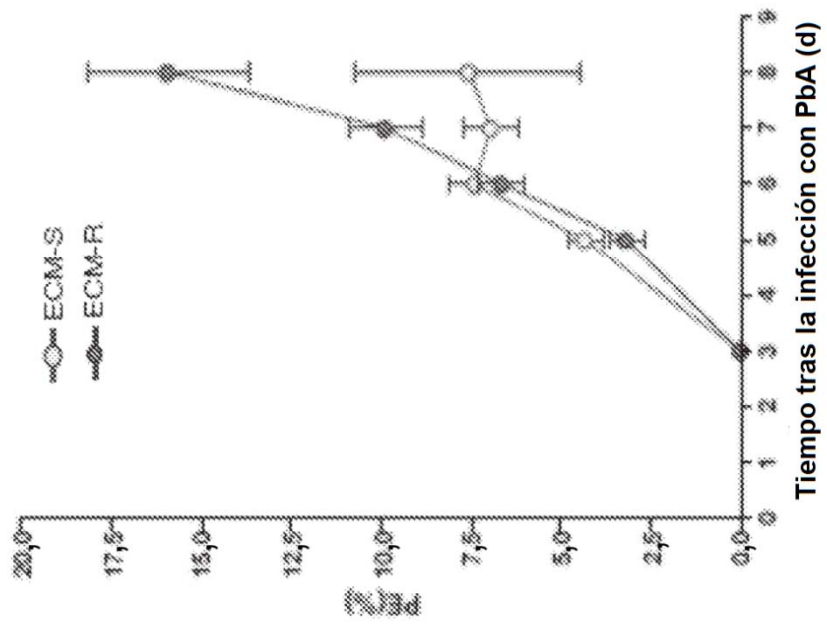


Figura 4

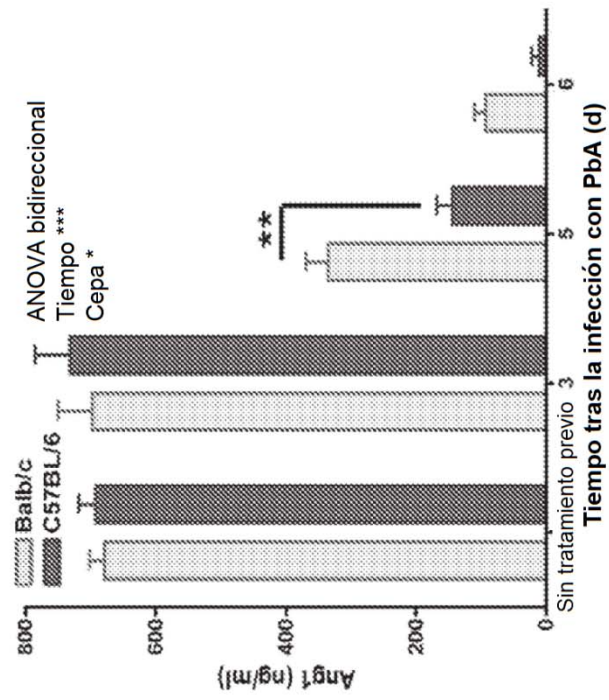


Figura 5

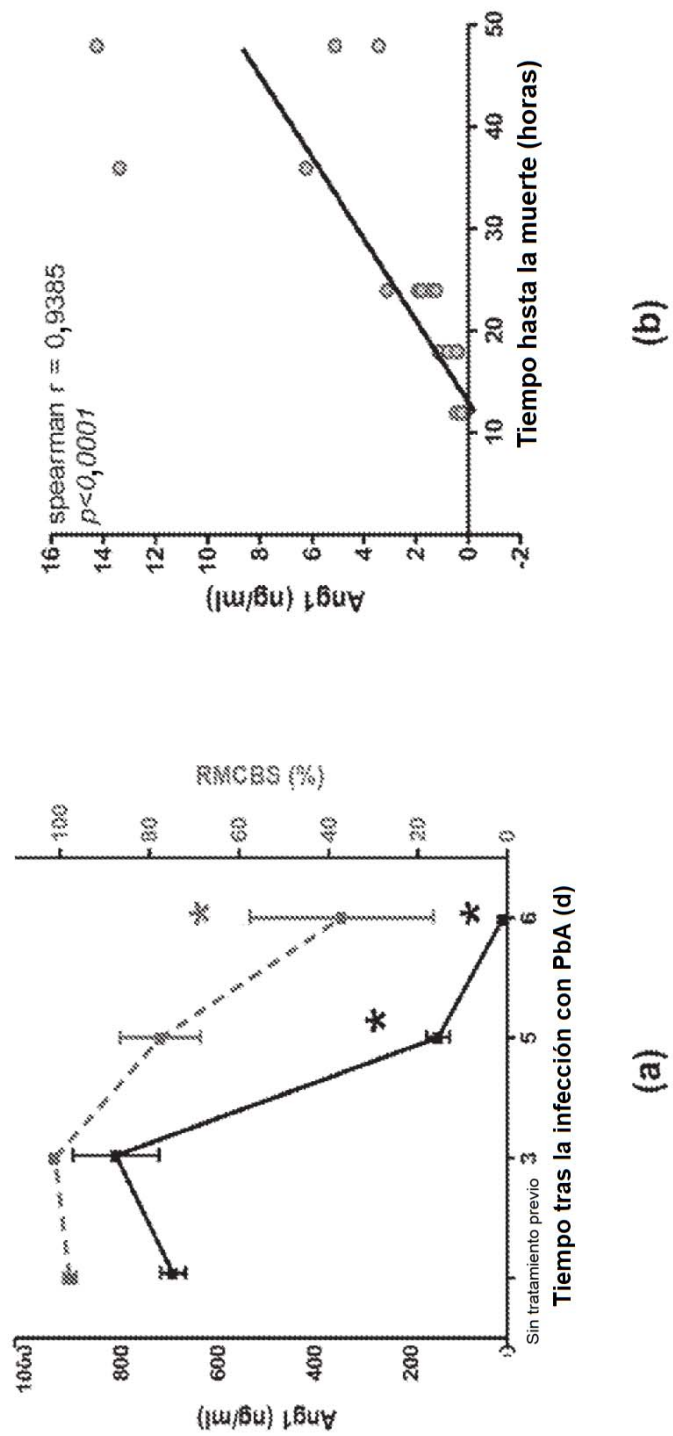


Figura 6

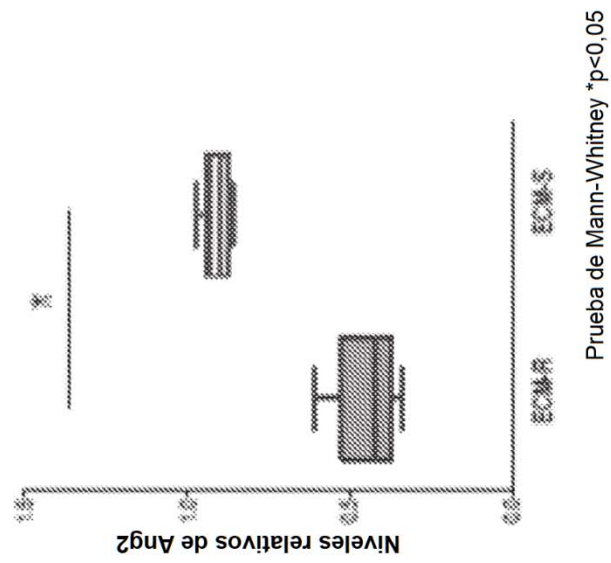


Figura 7

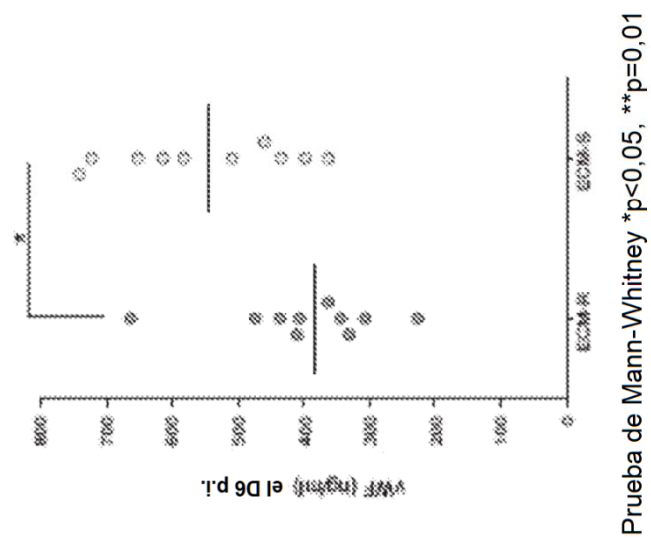


Figura 8

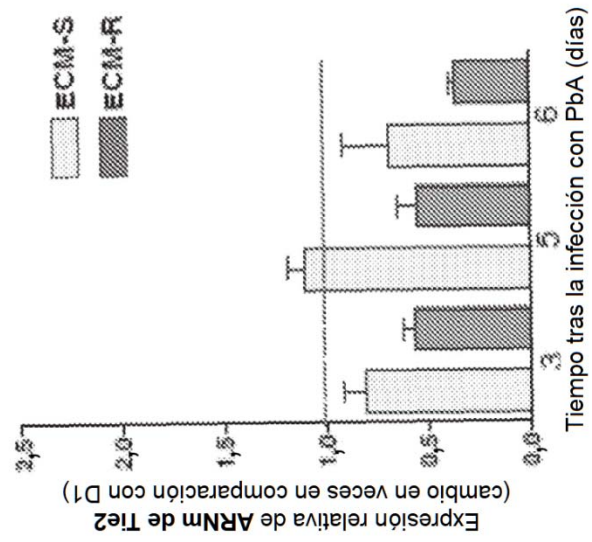


Figura 9

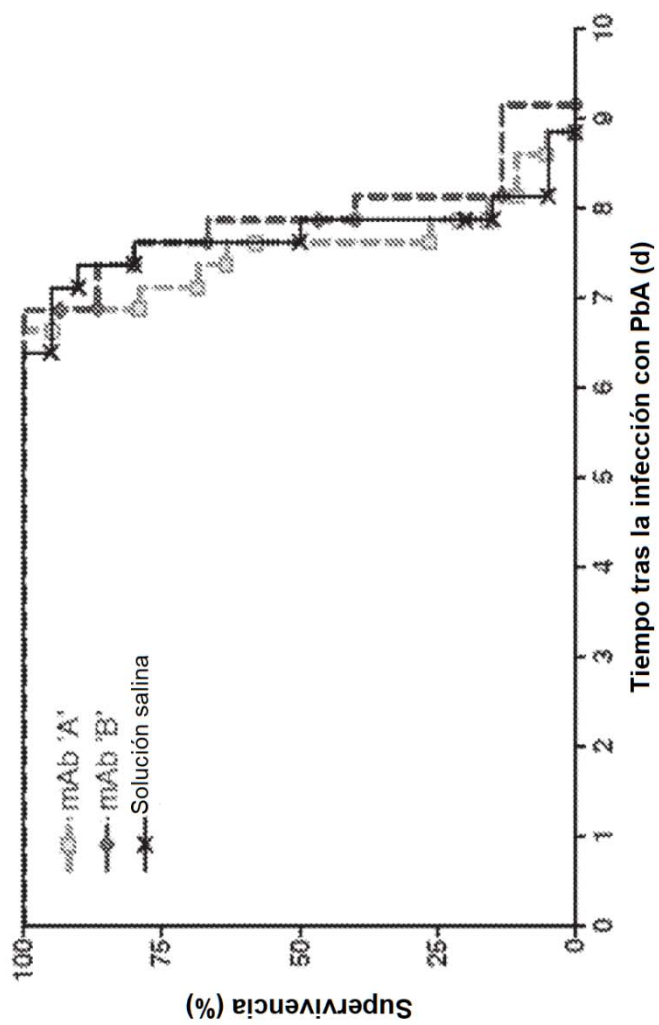


Figura 10

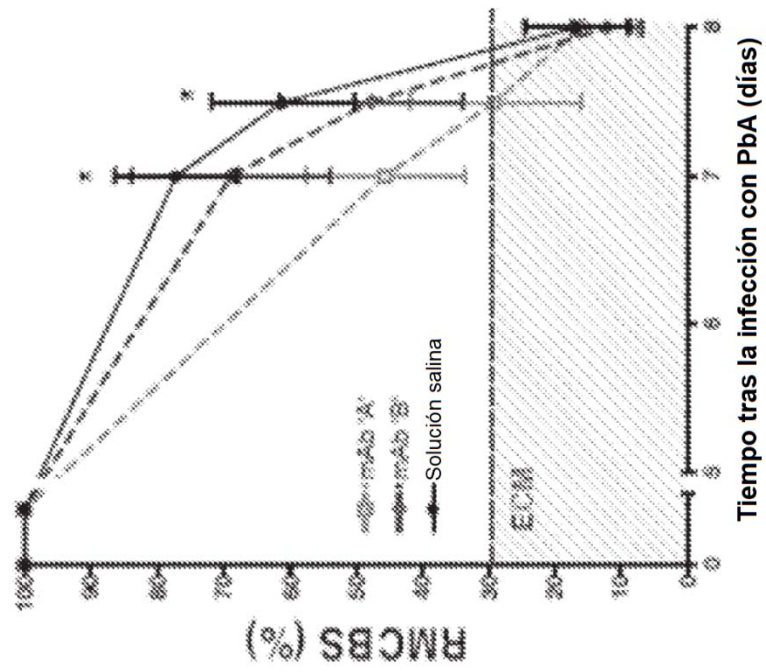


Figura 11

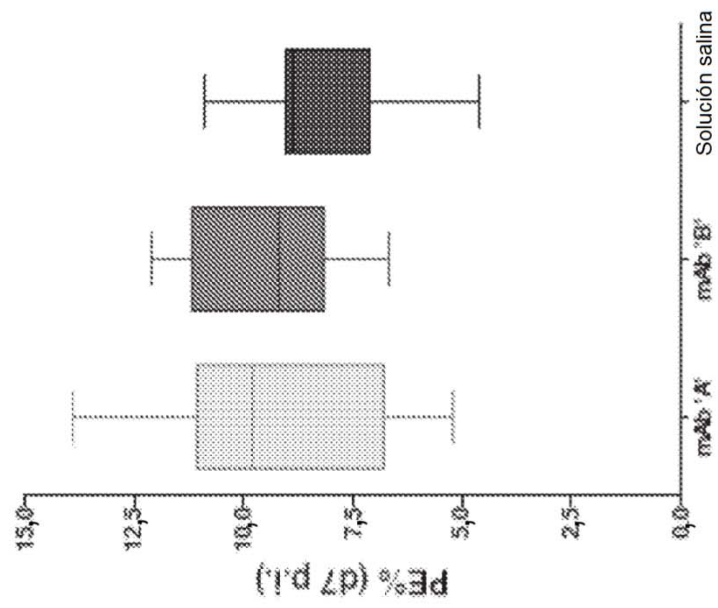


Figura 12

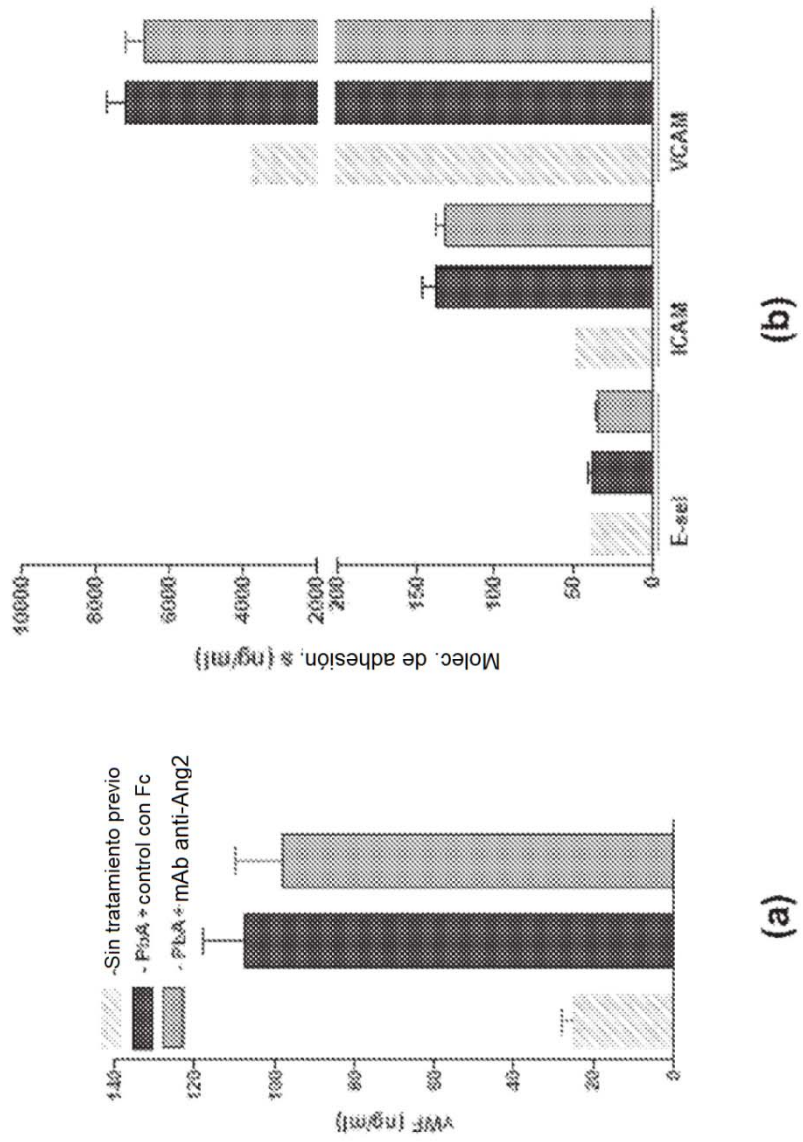


Figura 13

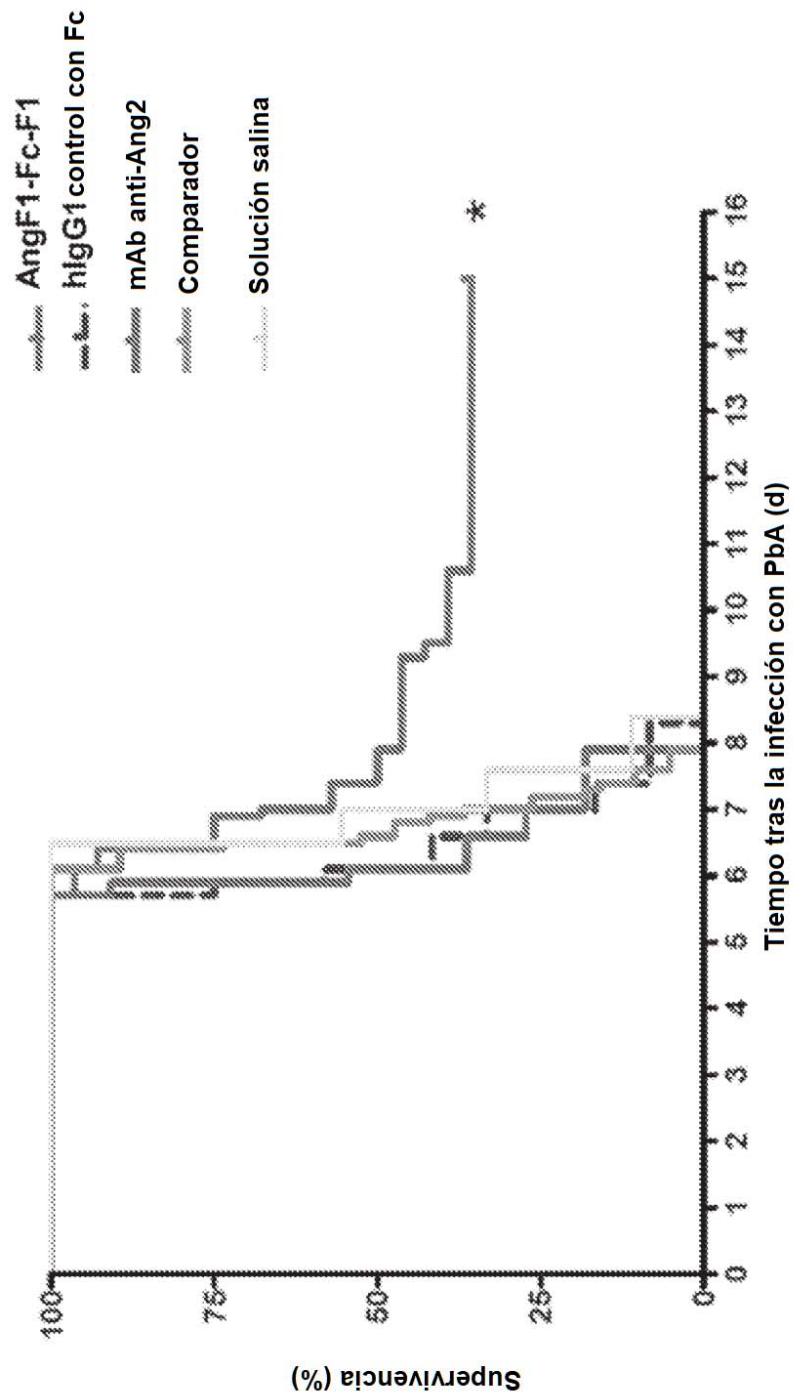


Figura 14

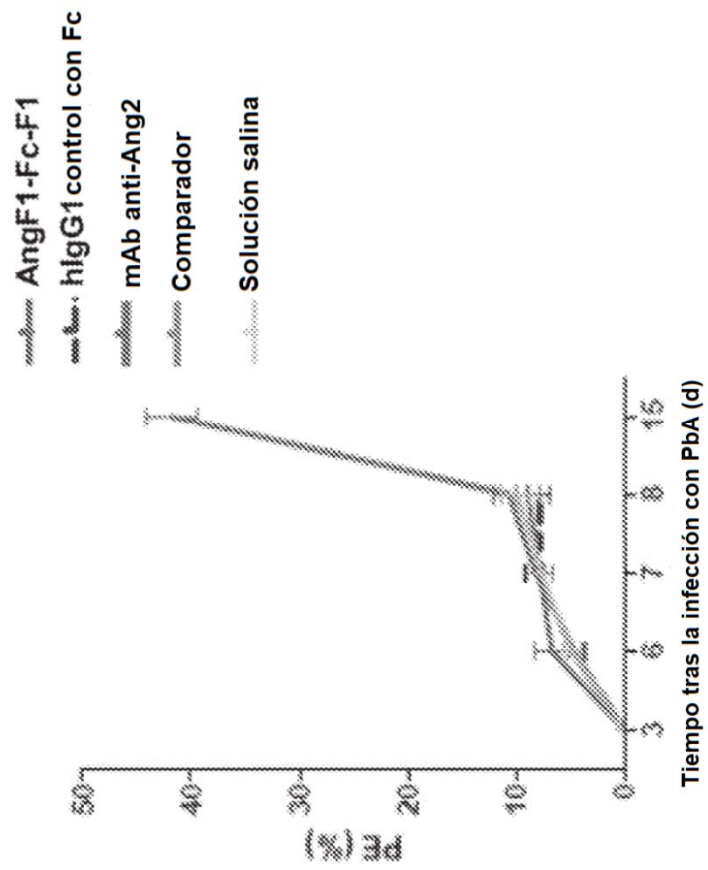
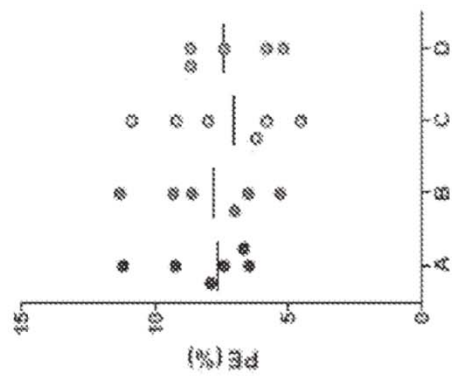
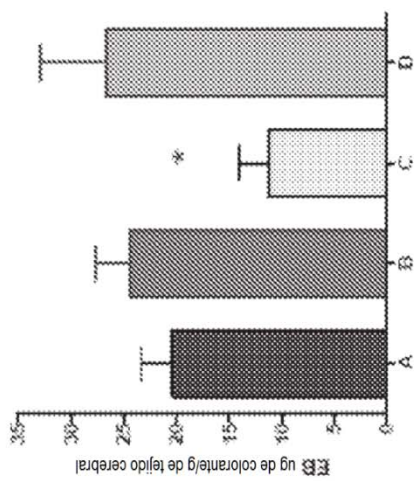


Figura 15



(b)



(a)

Figura 16

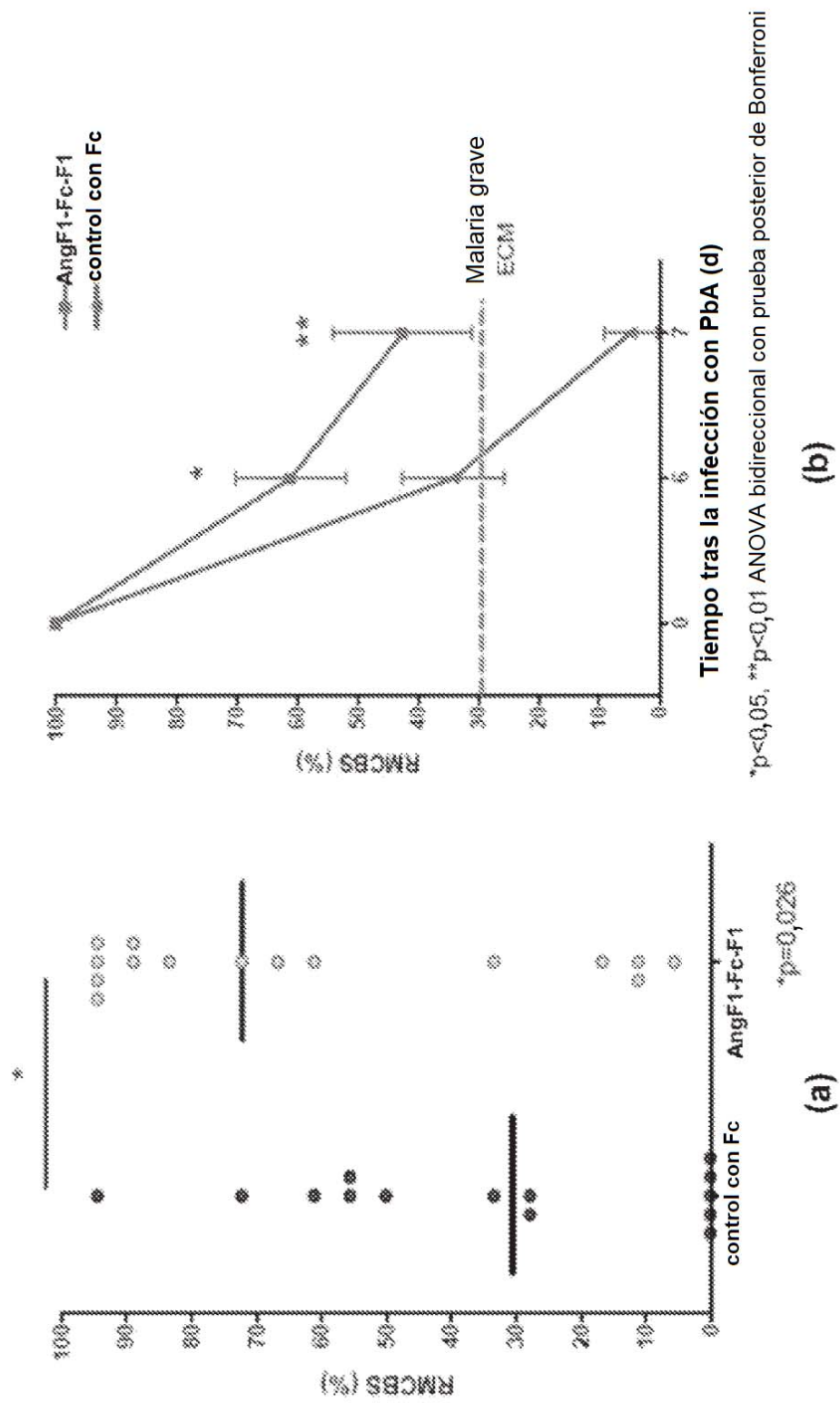


Figura 17

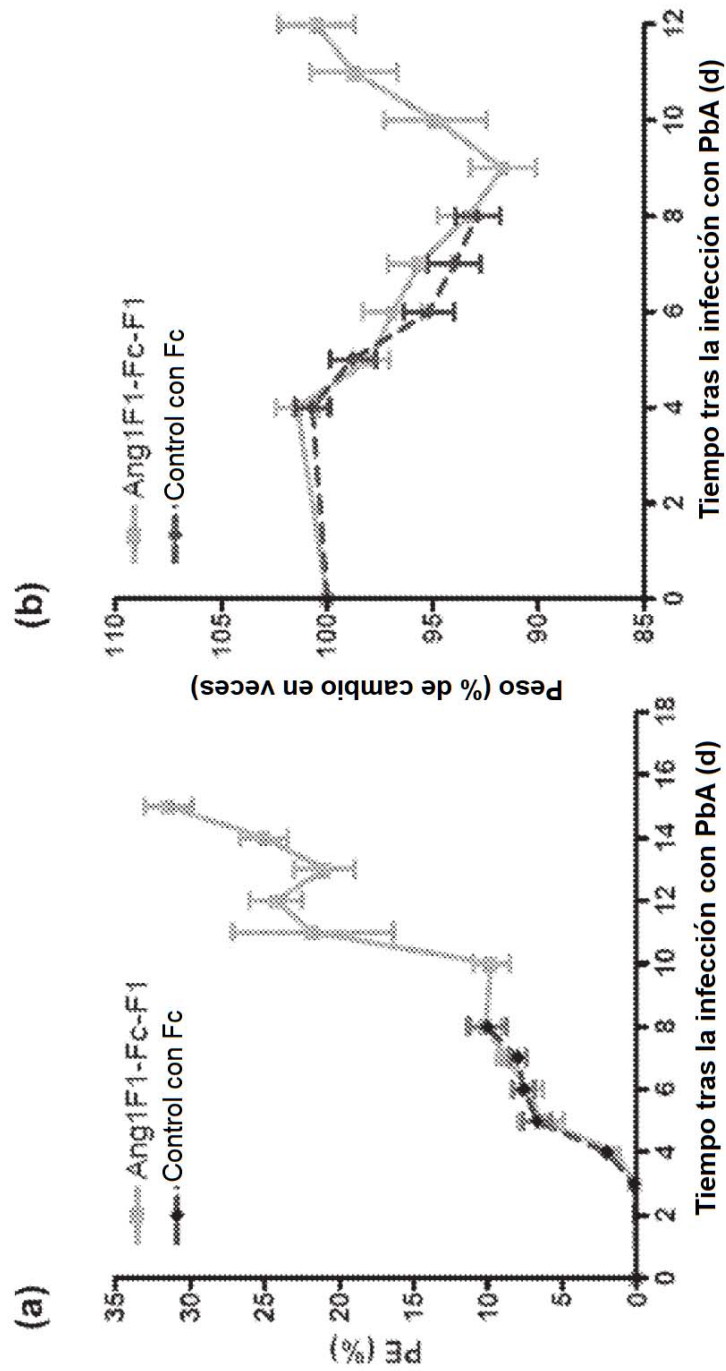


Figura 18

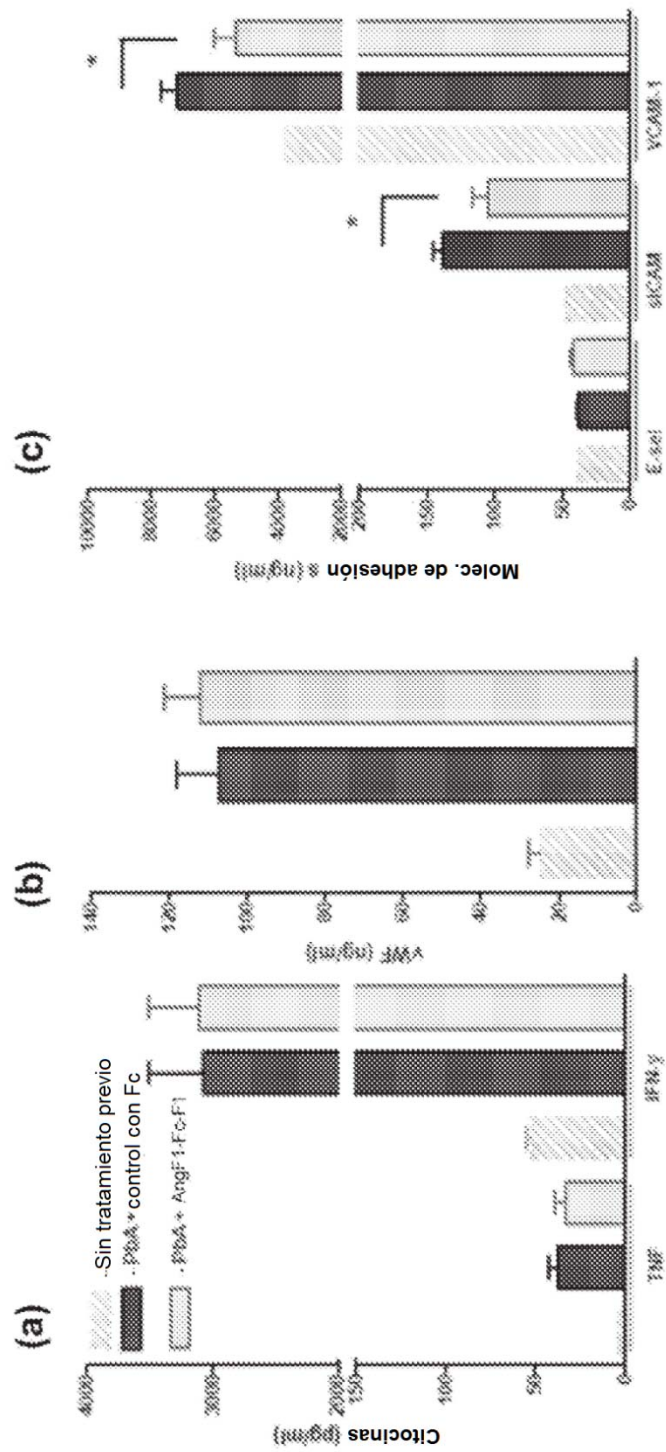


Figura 19

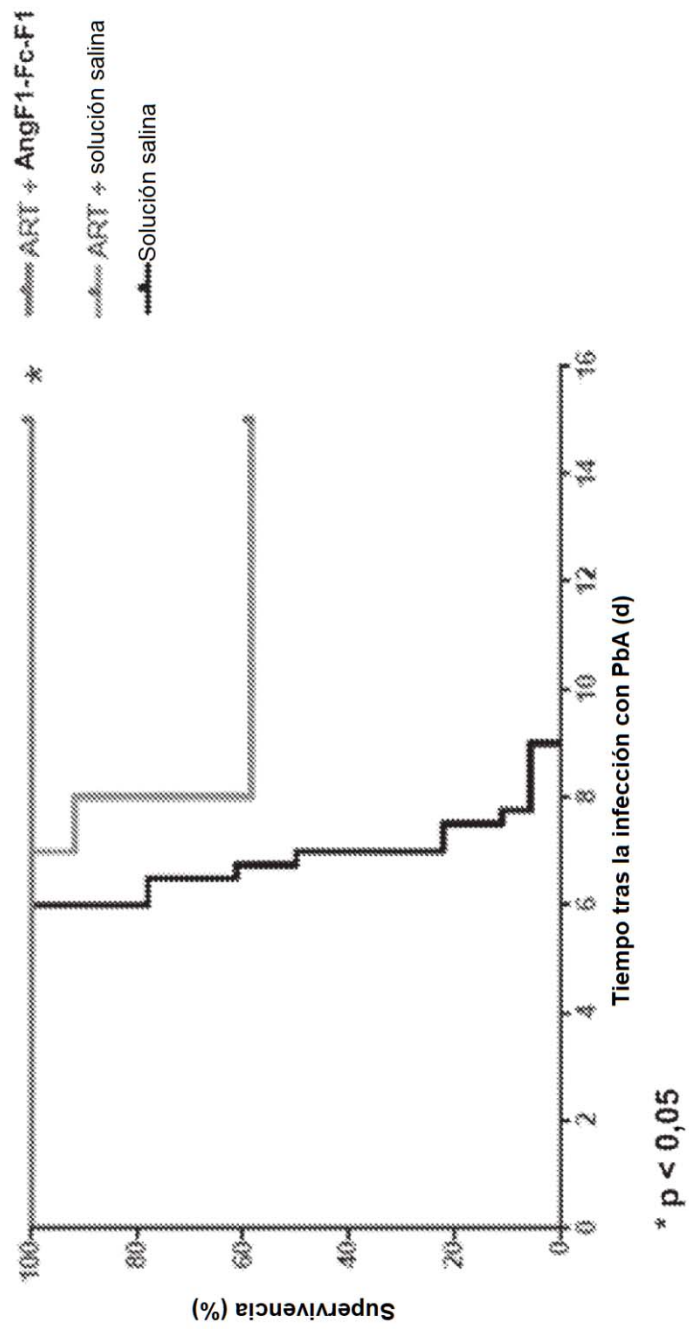


Figura 20

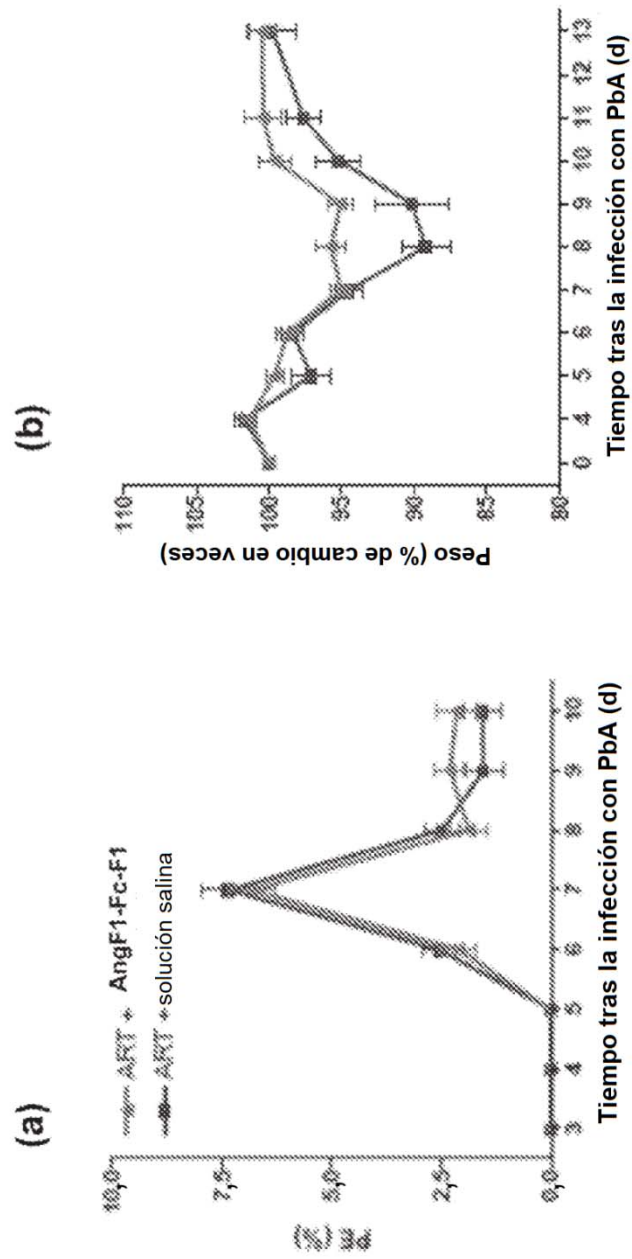


Figura 21