

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 509**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61K 31/13 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/216 (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2014 PCT/CA2014/000269**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14165963**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2014 E 14783323 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2019 EP 2983695**

54 Título: **Métodos, usos y composiciones de agonistas de Tie2**

30 Prioridad:

11.04.2013 US 201361810879 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2020

73 Titular/es:

SUNNYBROOK RESEARCH INSTITUTE (50.0%)
2075 Bayview Avenue
Toronto, Ontario M4N 3M5, CA y
UNITY HEALTH TORONTO (50.0%)

72 Inventor/es:

DUMONT, DANIEL;
VAN SLYKE, PAUL y
LEE, WARREN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 509 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

Métodos, usos y composiciones de agonistas de Tie2

Campo de la descripción

5 La descripción se refiere a métodos y usos de agonistas de Tie2. En particular, la descripción se refiere a métodos y usos para tratar la gripe y/o una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. La descripción también se refiere a composiciones que comprenden (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral y métodos y usos de las mismas.

Antecedentes de la descripción

10 El virus de la gripe humana tiene un costo terrible en la economía y la salud pública (Majury, 2005; Falsey y Walsh, 2006). A pesar de los programas de vacunación y los medicamentos antivirales, la gripe estacional sola causa aproximadamente 4000 muertes en Canadá anualmente (Schanzer et al., 2007) y es la causa de muerte por infección número uno en Ontario (Kuster et al., 2010). La gripe infecta el epitelio respiratorio y la mayoría de las muertes ocurren debido a complicaciones pulmonares. Alrededor de 25% de las muertes ocurren como resultado directo de la infección viral inicial (Louria et al., 1959), mientras que el resto se atribuye a una infección bacteriana superpuesta (también llamada sobreinfección bacteriana), como la neumonía por *Staphylococcus aureus* (Mohan et al., 2005). En ambos casos, el deterioro respiratorio está marcado por lesión pulmonar aguda (Dominguez-Cherit et al., 2009; Louria et al., 1959), un síndrome potencialmente mortal de edema pulmonar que ocurre debido a una mayor permeabilidad de la microvasculatura pulmonar (Lee y Slutsky, 2001). Los vasos sanguíneos en el pulmón están revestidos por una capa continua de endotelio; por lo tanto, la pérdida de la integridad de la barrera del endotelio microvascular pulmonar es un requisito previo para la lesión pulmonar aguda. Si bien existen medicamentos antivirales, solo reducen parcialmente la mortalidad (McGeer et al., 2007), deben administrarse temprano para que sean efectivos, y su uso se complica por el rápido desarrollo de resistencia. Por lo tanto, se necesitan desesperadamente nuevas terapias para los casos más graves de gripe.

25 A diferencia de los virus de la gripe aviar de alta patogenicidad (p. ej., gripe aviar H5N1) (Maines et al., 2008), las cepas de gripe humana carecen de ciertos aminoácidos básicos en sus moléculas de hemaglutinina; esto limita la escisión a las proteasas similares a tripsina que están contenidas dentro del tracto respiratorio. Por lo tanto, la gripe humana infecta principalmente el epitelio respiratorio, lo que conduce a lesiones epiteliales, apoptosis y descamación (Kuiken y Taubenberger, 2008). En infecciones no complicadas, estos cambios en el epitelio de las vías respiratorias son transitorios y el proceso de reparación es evidente en unos días. Sin embargo, en la neumonía viral primaria, el virus también infecta el pulmón distal, particularmente los neumocitos tipo I y el epitelio bronquiolar ciliado, conduciendo a daños en los alvéolos, incluido el desnudamiento alveolar franco (Kuiken y Taubenberger, 2008); también pueden ser infectados los neumocitos tipo II y los macrófagos alveolares. En la pandemia de gripe de 1957, las neumonías virales primarias representaron aproximadamente 20% de las muertes (Kuiken y Taubenberger, 2008). Sin embargo, el mecanismo de la lesión pulmonar en estos casos no está claro, ya que la apoptosis epitelial por sí sola no es suficiente para inducir fuga pulmonar (Mura et al., 2010).

35 Sin embargo, hasta la fecha, se ha pasado por alto en gran medida un posible efecto de la gripe en el endotelio pulmonar (Teijaro et al., 2011). *In vivo*, la infección epitelial y endotelial, la adhesión de plaquetas y otros factores tales como las citoquinas sistémicas y la liberación de gránulos de leucocitos pueden tener efecto sinérgico para inducir lesión pulmonar. Hasta la fecha, sin embargo, no se han descrito agentes para la gripe humana que se dirijan al endotelio pulmonar.

40 Además de la neumonía viral, en la pandemia de 1957 el resto de las muertes (75%) ocurrieron como consecuencia de sobreinfección bacteriana. La situación clínica clásica es de un paciente que inicialmente mejora después del inicio de la gripe, solo para deteriorarse notablemente tan pronto como 2-3 días después (Peltola y McCullers, 2004; Mohan et al., 2005) por la sobreinfección bacteriana con organismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*. Los datos de la autopsia de la epidemia de gripe de 1918 y los datos de modelos animales condujeron a la hipótesis comúnmente sostenida de que el virus causaba la inmunosupresión que conducía a una eliminación disminuida de bacterias (Speshock et al., 2007). Sin embargo, los antibióticos no estaban disponibles en 1918 y no se usan típicamente en modelos animales. De hecho, en la pandemia de gripe de 1957, cuando los antibióticos estaban fácilmente disponibles, la mayoría de los cultivos de pulmón de autopsia fueron negativos (Louria et al., 1959; Oseasohn et al., 1959). Por lo tanto, la administración casi universal de antibióticos empíricos de amplio espectro (McGeer et al., 2007) a pacientes con gripe grave (debido a la incertidumbre diagnóstica) hace que la replicación bacteriana *per se* sea poco probable como la causa de la lesión pulmonar aguda. En apoyo de esta idea, en un modelo de ratón de gripe y sobreinfección por *S. Aureus*, la muerte no podía explicarse por el crecimiento bacteriano sin restricciones, ni podía atenuarse por el agotamiento de los leucocitos (es decir, no era mediada por leucocitos) (Iverson et al., 2011).

55 Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE.UU. (CDC) recomiendan medicamentos antivirales con actividad contra los virus de la gripe como adyuvante importante de las vacunas contra la gripe en el control de la gripe (<http://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>). Los medicamentos antivirales se usan en el tratamiento, así como en la prevención de la gripe. Los medicamentos antivirales aprobados

por la FDA incluyen oseltamivir (Tamiflu®) y zanamivir (Relenza®). El beneficio clínico es mayor cuando los antivirales se administran temprano, especialmente en el espacio de las 48 horas posteriores al inicio de la enfermedad y su eficacia disminuye cuando se administra con retraso.

5 Se ha demostrado que todas las angiopoyetinas (Ang) 1-4 se unen y activan la actividad del receptor de tirosina quinasa Tie2 en diferentes grados. Todas las Ang se caracterizan estructuralmente por un dominio de super agrupación N-terminal (SCD) seguido de un dominio superenrollado (CCD) y un dominio tipo fibrinógeno C-terminal (FLD) (Ward y Dumont 2002; Tsigkos et al. 2003) Los estudios funcionales han resaltado un papel para el SCD y el CCD en la formación de multímeros homotípicos de alto orden de Ang (Procopio et al. 1999). La naturaleza
10 específica de estos multímeros es variable y es única para cada miembro de la familia de Ang. La especificidad de unión de las Ang para el receptor Tie2 se ha atribuido al FLD (Tsigkos et al. 2003; Procopio et al. 1999). Considerados en conjunto, son los atributos estructurales únicos de cada miembro de la familia de Ang lo que promueve la unión y la agrupación diferencial de Tie2. Se cree que los efectos fisiológicos pleiotrópicos de las Ang 1-4 son mediados, al menos en parte, por la agrupación adecuada y específica del receptor. Por ejemplo, los ratones diseñados para sobreexpresar el CCD de la Ang 1, capaz de multimerizar con Ang1 endógena producida en la
15 misma célula, produjeron patrones inadecuados de los vasos coronarios (Ward et al. 2004). Además, las formas quiméricas de la Ang 1 diseñadas para contener el FLD C-terminal y uno de varios CCD diferentes diferían en su capacidad para activar el receptor Tie2 (Cho et al. 2004a; Cho et al. 2004b).

Los autores de la presente invención diseñaron previamente péptidos miméticos de angiopoyetina que se unen a Tie2 y cuando se configuraban como dímero o tetrámero (el tetrámero se conoce como Vasculotida) dan como
20 resultado la agrupación del receptor y su activación (Van Slyke et al. 2009, David et al. 2011 y Kumpers et al. 2011; WO2008/049227).

La activación de Tie2 a través de la tetramerización de péptidos de unión a Tie2 de alta afinidad utilizando el modelo de biotina/avidina (Van Slyke et al. 2009) ha establecido el uso del péptido como agonista del receptor Tie2 para
25 promover la angiogénesis para aplicaciones en la curación de heridas diabéticas y otras indicaciones cardiovasculares. También se ha demostrado que la Vasculotida (VT) protege contra la fuga vascular. Los estudios que examinan el impacto de la VT en la permeabilidad endotelial *in vitro*, así como en la septicemia inducida por endotoxemia y polimicrobiana, demostraron que la VT era capaz de prevenir y/o invertir la permeabilidad endotelial inducida por estos tratamientos. Además, la VT era capaz de prevenir la escisión de las interacciones de célula endotelial (EC):célula endotelial (EC) *in vitro* ilustrando aún más su capacidad para inhibir la permeabilidad vascular
30 (David et al. 2011).

Compendio de la descripción

Los autores de la presente invención han demostrado que la administración de una forma multimérica de un péptido de unión a Tie2 llamado "Vasculotida" puede aumentar la supervivencia en un modelo de ratón de neumonía viral primaria y lesión pulmonar aguda debido a la infección viral de gripe, y aumentar la supervivencia cuando se
35 coadministra con un fármaco antiviral. El aumento en la supervivencia persiste incluso cuando la Vasculotida se administra de forma retrasada (es decir, después del inicio de la infección por gripe). Los autores de la invención también han demostrado que la infección en dosis baja por gripe predispone al endotelio pulmonar a una mayor fuga tras la exposición posterior a bacterias, un fenómeno conocido como cebado, y que la Vasculotida es capaz de anular esta fuga inducida por cebado.

40 La presente invención se define en las reivindicaciones.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método de tratamiento de un animal o célula infectada con gripe que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para tratar un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para tratar un animal o célula infectada con gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para su uso en el tratamiento de un animal o célula infectada con gripe.
45

La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal infectado con gripe que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para aumentar la supervivencia y/o
50 disminuir la mortalidad en un animal infectado con gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal infectado con gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en el aumento de la supervivencia y/o disminución de la mortalidad en un animal infectado con gripe.

La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe. Además se
55

proporciona un agonista de Tie2 para usar en la disminución de la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe.

5 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para aumentar la saturación de oxígeno arterial en un animal infectado con gripe, que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para aumentar la saturación de oxígeno arterial en un animal infectado con gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para aumentar la saturación de oxígeno arterial en un animal infectado con gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en el aumento de la saturación de oxígeno arterial en un animal infectado con gripe.

10 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método de tratamiento de una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite, que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para tratar una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para tratar una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en el tratamiento de una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite.

15 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe, que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en el aumento de la supervivencia y/o la disminución de la mortalidad en un animal con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe.

25 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe, que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en la disminución de la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe.

El agonista de Tie2 se puede administrar de cualquier manera adecuada, incluyendo, sin limitación, por vía tópica, sistémica, oral, intranasal o por inhalación.

35 En una realización, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 24 horas después de la infección. En otra realización, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 48 horas después de la infección. En otra realización más, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 72 horas después de la infección.

40 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método de tratamiento de un animal o célula infectada con gripe que comprende administrar (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral. La descripción también proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para tratar un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral en la preparación de un medicamento para tratar un animal o célula infectada con gripe. Además se proporciona (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para usar en el tratamiento de un animal o célula infectada con gripe.

45 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal infectado con gripe, que comprende administrar (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral. La descripción también proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal infectado con gripe. También se proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral en la preparación de un medicamento para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal infectado con gripe. Además se proporciona (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para usar en el aumento de la supervivencia y/o disminución de la mortalidad en un animal infectado con gripe.

55 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe, que comprende administrar (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral. La descripción también proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal infectado con gripe. También se proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral en la preparación de un medicamento para disminuir la fuga endotelial

pulmonar en un animal infectado con gripe. Además se proporciona (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para usar en la disminución de la fuga endotelial pulmonar en un animal infectado con gripe.

5 El agonista de Tie2 se puede administrar de cualquier manera adecuada, incluyendo, sin limitación, por vía tópica, sistémica, oral, intranasal o por inhalación. El agente antiviral también se puede administrar de cualquier manera adecuada, incluyendo, sin limitación, por vía tópica, sistémica, oral, intranasal o por inhalación.

10 El agonista de Tie2 y el agente antiviral se pueden administrar simultáneamente (al mismo tiempo). El agonista de Tie2 y el agente antiviral también se pueden administrar secuencialmente. El agonista de Tie2 se puede administrar antes que el agente antiviral o el agente antiviral se puede administrar antes que el agonista de Tie2. En una realización, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 24 horas después del agente antiviral. En otra realización, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 48 horas después del agente antiviral. En otra realización más, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 72 horas después del agente antiviral.

En una realización, la gripe es gripe humana.

15 La presente descripción también proporciona una composición que comprende (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral. Opcionalmente, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción también proporciona un kit que comprende (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral. En una realización, el kit comprende además instrucciones de uso para tratar la gripe en un animal o célula que lo necesita.

20 En una realización, el agente antiviral es un inhibidor de un virus de la gripe. En otra realización, el agente antiviral es amantadina, rimantadina, zanamivir, peramivir, virmidina, ribavirina u oseltamivir (también conocido como Tamiflu®). En otra realización, el agente antiviral es oseltamivir (Tamiflu®).

En una realización, el agonista de Tie2 es un agente de unión y/o activación. En una realización, el agonista de Tie2 se une al receptor Tie2 directamente y, por lo tanto, es un agente de unión y activación de Tie2. En otra realización, el agonista de Tie2 activa el receptor Tie2 indirectamente y, por lo tanto, es un agente de activación de Tie2.

25 En una realización, el agonista de Tie2 comprende una angiopoyetina-1 o un ácido nucleico que codifica la angiopoyetina-1. En otra realización, el agonista de Tie2 comprende un inhibidor de la angiopoyetina-2, tal como un anticuerpo bloqueante o peptícuerpo contra la angiopoyetina-2 o un ácido nucleico antiparalelo contra la angiopoyetina-2.

En otra realización, el agonista de Tie2 comprende una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie2.

30 La forma multimérica puede ser, por ejemplo, un dímero, tetrámero o una forma multimérica que comprende seis, ocho, diez o doce unidades del monómero. En otra realización, la forma multimérica comprende un número impar de unidades, tales como tres, cinco, siete, nueve u once unidades.

35 En otra realización más, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende una estructura: A-B-C, en donde A comprende un péptido de unión a Tie2, B comprende un espaciador y C comprende un grupo de multimerización, en donde C tiene afinidad por D, un agente multimérico que comprende múltiples sitios de unión para C. Por ejemplo, el agente multimérico D puede tener cuatro sitios de unión para el grupo C de multimerización de modo que se forma un tetrámero cuando cuatro monómeros peptídicos de unión a Tie2, A-B-C, interaccionan con el agente multimérico D. En una realización, C comprende un grupo biotina y D comprende un agente seleccionado del grupo que consiste en avidina, estreptavidina y neutravidina. En otra realización más, B comprende polietilenglicol (PEG).

40 En una realización adicional, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende una estructura: A-B, en donde A comprende un péptido de unión a Tie2 y B comprende un espaciador común, en donde la forma multimérica se crea por enlace covalente de múltiples péptidos de unión a Tie2 a través del espaciador común B. En una realización, B comprende polietilenglicol (PEG).

45 Los péptidos de unión a Tie2 para usar en los monómeros incluyen, pero no se limitan a, un péptido T7 como se muestra en las SEQ ID NO: 1 o 2, un péptido GA3 como se muestra en las SEQ ID NO: 3 o 4, un péptido T6 como se muestra en las SEQ ID NO: 7 u 8 o un péptido T8 como se muestra en las SEQ ID NO: 5 o 6. En una realización alternativa, el péptido de unión a Tie2 es un péptido T4 como se muestra en las SEQ ID NO: 9 o 10.

50 En otra realización, la forma multimérica es un dímero, que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; y (c) un resto de unión que conecta dichas cadenas peptídicas primera y segunda, en donde dicho dímero peptídico se une y activa el receptor Tie2. En una realización, la primera cadena peptídica es un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2) y/o la segunda cadena peptídica es un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2). Opcionalmente, el resto de unión comprende uno o más polímeros solubles en agua unidos covalentemente a la primera cadena peptídica y la segunda cadena peptídica. El uno o más polímeros solubles en agua pueden ser polímeros lineales. En una realización, el polímero soluble en agua es un polietilenglicol (PEG), que opcionalmente

tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3 000 Daltons a 50 000 Daltons o aproximadamente 3 000 Daltons a 20 000 Daltons. En diversas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 3 000, aproximadamente 3 400, aproximadamente 5 000, aproximadamente 10 000, aproximadamente 15 000, aproximadamente 20 000, aproximadamente 25 000, aproximadamente 30 000 o aproximadamente 40 000 Daltons.

- 5 En otra realización más, la forma multimérica comprende un tetrámero peptídico, que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; (c) una tercera cadena peptídica; (d) una cuarta cadena peptídica; y (e) un resto de unión que conecta dichas cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta, en donde dicho tetrámero peptídico se une y activa el receptor Tie2. Opcionalmente, la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas son péptidos T7 (SEQ ID NO: 1 o 2). El resto de unión puede comprender uno o más polímeros solubles en agua unidos covalentemente a la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas. En una realización, el polímero soluble en agua es un polímero soluble en agua de cadena ramificada, tal como PEG. El PEG ramificado puede tener un peso molecular en un intervalo de aproximadamente 3 000 Daltons a aproximadamente 50 000 Daltons o de aproximadamente 3 000 Daltons a aproximadamente 20 000 Daltons. En diversas realizaciones, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 3 000, aproximadamente 3 400, aproximadamente 5 000, aproximadamente 10 000, aproximadamente 15 000, aproximadamente 20 000, aproximadamente 25 000, aproximadamente 30 000 o aproximadamente 40 000 Daltons.

Las formas multiméricas descritas en el presente documento presentan actividad agonista de Tie2. Por ejemplo, la forma multimérica estimula la fosforilación de Tie2 o estimula la fosforilación de MAPK, AKT y eNOS.

- 20 En una realización particular, la forma multimérica es un tetrámero y el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende una estructura: A-B-C, en donde:

A comprende un péptido de unión a Tie2 seleccionado de un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2) y un péptido GA3 (SEQ ID NO: 3 o 4);

B comprende un espaciador de polietilenglicol; y

C comprende un grupo de biotina,

- 25 en donde cuatro copias de A-B-C están asociadas con un agente tetrámero, D, para crear la forma de tetrámero, seleccionándose el agente tetrámero, D, del grupo que consiste en avidina, estreptavidina y neutravidina.

Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos al tiempo que indican realizaciones de la descripción se dan solo a modo de ilustración.

30 **Breve descripción de los dibujos**

La descripción se describirá ahora en relación con los dibujos en los que:

- 35 La Figura 1 muestra (A) la histología (HyE) de un pulmón no infectado con un haz broncovascular normal y alvéolos circundantes; (B) un pulmón infectado (3 días después de infección) que muestra bronquiolitis, peribronquiolitis con inflamación intersticial focal y septos alveolares congestionados; (C) una vista de mayor potencia del pulmón infectado de (B) que muestra una marcada marginación de las células inflamatorias y cambio reactivo del endotelio (flechas), así como también restos necróticos dentro de la luz bronquiolar; (D) el efecto de la gripe en el peso del ratón. Se inoculó a ratones C57Bl/6 por vía intranasal gripe X31 (128 unidades de hemaglutinina (HAU)) o solución salina y se pesaron diariamente; y (E) la fuga microvascular pulmonar depende de la dosis. Los ratones se infectaron por vía intranasal con 64 o 128 HAU de gripe y se midió la fuga vascular pulmonar por la fuga de colorante azul de Evans el día 4 ($p < 0.01$ por ANOVA).

La figura 2 muestra que el péptido agonista de Tie2 Vasculotida (VT) prolonga la supervivencia en la gripe grave. Ratones C57Bl/6 se infectaron por vía intranasal con 128 HAU de gripe y recibieron VT (400 ng) o vehículo por vía intraperitoneal (IP) en el momento de la infección y diariamente. Los datos son de 2 experimentos con 18 ratones, * $p = 0.0131$ por prueba de log-rank.

- 45 La Figura 3 muestra que (A) el péptido agonista de Tie2 Vasculotida (VT) aumenta la supervivencia en la gripe grave incluso si la administración se retrasa, al contrario de lo que cabría esperar a partir de la bibliografía donde la eficacia disminuye si se administra de manera retardada. Esto tiene una relevancia clínica particular ya que a menudo se desconoce el momento preciso del inicio de la infección (exposición al virus). Ratones C57Bl/6 se infectaron por vía intranasal con 64 HAU de la gripe (la mitad de la dosis utilizada en la Figura 2) y recibieron VT (400 ng) o vehículo por vía intraperitoneal (IP) empezando (VT0) en el momento de la infección o 24-72 horas después (VT24, VT48, VT72) y después diariamente. Los números entre paréntesis indican el número de ratones en cada grupo. Los datos provienen de 2 experimentos con 25 ratones, * $p = 0.0004$ por prueba de log-rank para todas las curvas; $p = 0.0113$ para VT0 frente a gripe sola; $p = 0.0029$ para VT24 frente a gripe sola; $p = 0.0029$ para VT48 frente a gripe sola; $p = 0.0113$ para VT72 frente a gripe sola; y (B) VT disminuye la hipotermia inducida por la gripe,

incluso si se administra con retraso. ANOVA de una vía con prueba posterior de Bonferroni $p = 0.0117$; $p < 0.05$ para la gripe sola en comparación con VT0, VT24 y VT72.

La Figura 4 muestra el efecto de Vasculotida en el edema pulmonar. La vasculotida (400 ng, IP diariamente) reduce la fuga microvascular pulmonar según se mide por la relación húmedo/seco el día 3 después de la infección, $p = 0.0005$ por ANOVA de una vía y $p < 0.05$ para gripe frente a gripe/VT y control frente a gripe por prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. $n = 18$ ratones de 2 experimentos.

La Figura 5 muestra que la Vasculotida (400 ng IP, diariamente) aumenta la supervivencia del ratón cuando se administra simultáneamente con el fármaco antiviral amantadina (Amant; 46 mg/kg/día en 3 dosis divididas). * $p = 0.02$ por prueba de log-rank (Mantel-Cox), $n = 12$ ratones de 1 experimento. Los ratones fueron infectados con 128 HAU de la gripe.

La Figura 6 muestra que (A) la Vasculotida (400 ng IP, diariamente) aumenta la supervivencia del ratón cuando se administra con el fármaco antiviral amantadina (Amant; 46 mg/kg/día en 3 dosis divididas) incluso si se administraba VT 24-72 horas después (VT24, VT48, VT72; los números entre paréntesis indican el número de ratones por grupo). * $p < 0,0001$ por prueba de log-rank (Mantel-Cox), $n = 30$ ratones de 3 experimentos. $P = 0.03$ para Amant frente a VT48/Amant, $p = 0.01$ para Amant frente a VT72/Amant; Estos datos (y los de la Figura 5) demuestran que la VT no disminuye la eficacia de los fármacos antivirales y que, por lo tanto, la VT podría administrarse de manera segura junto con fármacos antivirales. Los ratones se infectaron con 64 HAU de gripe, la mitad de la dosis utilizada en la Figura 5. (B) (línea de base) y (C) (día 4) muestran que la VT mejora significativamente la oxigenación incluso si se administra 24-72 horas después de infección; $p < 0.0001$ por ANOVA de una vía con la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. $P < 0.05$ para Amant frente a VT24/Amant; $p < 0.05$ para Amant frente a VT48/Amant, $p < 0.05$ para Amant frente a VT72/Amant. (D) VT tiende a prevenir la hipotermia inducida por la gripe; $p = 0.06$ por ANOVA de una vía con la prueba de Tukey. (E) VT disminuye la pérdida de peso inducida por la gripe, incluso si se administra 48 horas después de infección; $p = 0.0158$ por ANOVA de una vía; $p < 0.05$ para VT48/Amant frente a Amant sola.

La Figura 7 muestra que los efectos beneficiosos de la Vasculotida son mediados por la acción sobre el endotelio y no se deben a una replicación viral alterada. (A) Las unidades formadoras de placa viral se midieron 4 días después de la infección de homogeneizados de pulmón de ratón ($n = 3$ por grupo) y se corrigieron por peso pulmonar; los ratones recibieron 400 ng de Vasculotide (o vehículo) IP diariamente. (B) Se añadió virus de la gripe al endotelio microvascular pulmonar humano primario durante 1 hora, después las células se lavaron para eliminar el virus no internalizado. Luego se añadió Vasculotida (2 ng/ml). La replicación viral se cuantificó por qPCR para la proteína M1 del virus de la gripe A después de 24 horas usando ARN 18S como referencia. Los resultados son medias y DE de 3 experimentos. (C) El beneficio de la Vasculotida no se debe a una quimiotaxis de leucocitos alterada. Los monocitos humanos (THP-1) se incubaron con 2 ng/ml de VT o vehículo, después se permitió que migraran a través de un Transwell en respuesta a ATP (10 μ M). Se contó el número de células migradas. Se obtuvieron resultados similares con monocitos J774 de ratón. (D) La Vasculotida tampoco tiene efecto sobre la quimiotaxis de neutrófilos. Se realizó el mismo experimento que en la Figura 5C, pero utilizando neutrófilos humanos expuestos al péptido formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina 10 nM (fMLP).

La Figura 8 muestra que la infección previa con gripe conduce a una permeabilidad endotelial sinérgica tras la exposición a *S. aureus* que es independiente de la polaridad endotelial. (A) El endotelio microvascular pulmonar humano sembrado sobre Transwell se infectó con virus de la gripe con una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1. 16 horas después, se añadió *S. aureus* (10^7 ufc/ml) inactivada por calor durante 24 horas y se midió la permeabilidad a la fluoresceína-Na (1 μ g/ml). (B) El efecto de aumentar el intervalo de tiempo entre la gripe y *S. aureus*: se añadió *S. aureus* 16-72 horas después del virus de la gripe y se midió la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) 24 horas más tarde. En cada tiempo de medición, la infección secuencial por virus de la gripe y *S. aureus* indujo una marcada pérdida de integridad de la barrera que es mayor que la suma debida a cualquier infección sola. Los datos son medias y DE de 3 experimentos independientes. (C) Células tratadas como en (B) pero las células se infectaron con virus de la gripe, MOI 1.0, 24 horas. Todavía se produce aumento de la fuga después de *S. aureus*. (D) Todavía se produce cebado después de infección basolateral del endotelio. Las células se trataron como en (C), pero las células se infectaron con virus de la gripe en la membrana basal durante 24 horas. (E) El cebado es específico del orden: se añadió primero *S. aureus* inactivada por calor al endotelio durante 24 horas, seguido del virus de la gripe (MOI 0.1) durante 24 horas. La infección con bacterias primero seguida por el virus no induce una fuga mayor. (F) El virus de la gripe no aumenta la unión/internalización de *S. aureus*. El endotelio pulmonar se infectó con virus de la gripe (MOI 1) durante 24 horas, después se añadieron 10^7 ufc/ml de *S. aureus*. Después de 40 minutos, las células se lavaron 3 veces para eliminar las bacterias no unidas o no internalizadas. Luego se lisaron las células y se sembraron en placa bacterias adherentes e internalizadas.

La Figura 9 muestra (A) que la Vasculotida previene la permeabilidad endotelial inducida por cebado *in vitro*. Endotelio pulmonar humano infectado con gripe (MOI 0.1) durante 24 horas seguido de *S. aureus* con o sin 2 ng/ml de Vasculotida. La resistencia eléctrica transendotelial (TEER) se midió 24 horas después y se comparó con el valor basal. (B) Vasculotida previene la fuga vascular inducida por cebado *in vivo*. Edema pulmonar (relación pulmón húmedo/seco) después de infección de ratones C57/BL6 con virus de la gripe (32HAU) seguido 3 días después por inyección en la vena de la cola de *S. aureus* (estafilococo) inactivada por calor. 12 horas después, los ratones se

sacrificaron y se midió el edema pulmonar. En un grupo de ratones, se administró VT (400 ng) 4 horas antes de *S. aureus*. N = 11 de un experimento; p <0.05 para gripe/estafilococo frente a gripe sola y para gripe/estafilococo/VT frente a gripe/estafilococo. (C) La vasculotida atenúa la escisión de caspasa-3 causada por infección secuencial. Se muestran transferencias Western para caspasa-3 escindida en células infectadas con gripe (MOI 0.1) durante 24 horas seguido de *S. aureus* con o sin 2 ng/ml de Vasculotida. Beta-actina era el control de carga.

Descripción detallada de la descripción

Los autores de la presente invención han demostrado que la administración de una forma multimérica de un péptido de unión a Tie2 llamado "Vasculotida" puede aumentar la supervivencia en un modelo de ratón de neumonía viral primaria y lesión pulmonar aguda, y aumentar la supervivencia cuando se coadministra con un fármaco antiviral. Los autores de la invención también han demostrado que la infección en dosis baja por virus de la gripe predispone al endotelio pulmonar a una mayor fuga tras la exposición posterior a bacterias, un fenómeno conocido como cebado y que la Vasculotida puede anular esta fuga inducida por cebado.

Definiciones:

Como se usa en el presente documento, el término "Vasculotida" se refiere a un péptido tetramérico que se une y activa el receptor Tie2. La Vasculotida comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; (c) una tercera cadena peptídica; (d) una cuarta cadena peptídica; y (e) un resto de conexión que conecta dichas cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta, en donde las cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta son péptidos T7 y el resto de unión es PEG de 10 000 Dalton. Se encuentran más detalles sobre la preparación de Vasculotida en los Ejemplos. En otra realización, el ácido mercaptopropiónico reemplaza a la cisteína.

Como se usa en el presente documento, el término "Tie2" se refiere a un receptor de proteína tirosina quinasa que es expresado casi exclusivamente en células endoteliales y progenitoras y que también se conoce en la técnica como TEK, p140 TEK, CD202B y VMCM. El término "Tie2" pretende abarcar el receptor de cualquier especie que exprese este receptor. En una realización, Tie2 es un Tie2 humano. El ARNm y las secuencias de proteínas de Tie2 humano se exponen en los números de acceso de GenBank NM_000459 y NP_000450, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "angiopoyetina" se pretende que se refiera a una cualquiera de una familia de factores de crecimiento de proteínas conocidos como ligandos para Tie2, que incluyen angiopoyetina 1 (o Ang1), angiopoyetina 2 (o Ang2), angiopoyetina 3 (o Ang 3) y angiopoyetina 4 (o Ang 4). El término "angiopoyetina" pretende abarcar el factor de crecimiento de cualquier especie que exprese el factor de crecimiento, opcionalmente miembros de la familia de angiopoyetinas humanas. El ARNm y las secuencias de proteínas de Ang 1 humana se exponen en los números de acceso de GenBank NM_001146 y NP_001137, respectivamente. El ARNm y las secuencias de proteínas de Ang 2 humana se exponen en los números de acceso de GenBank NM_001147 y NP_001138, respectivamente. El ARNm y las secuencias de proteínas de Ang 4 humano se exponen en los números de acceso de GenBank NM_015985 y NP_057069, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "MAPK" se pretende que se refiera a la proteína quinasa activada por mitógeno, también conocida como ERK o quinasa regulada por señales extracelulares, una quinasa intracelular que es fosforilada tras la activación de Tie2. El término "MAPK" pretende abarcar la quinasa de cualquier especie que exprese la quinasa, opcionalmente MAPK humana. El ARNm y las secuencias de proteínas de MAPK humano se exponen en los números de acceso de GenBank NM_002736 y NP_002745, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "AKT" se pretende que se refiera a una proteína quinasa también conocida como homólogo del oncogén viral del timoma murino v-akt, una quinasa intracelular que es fosforilada tras la activación de Tie2. El término "AKT" pretende abarcar la quinasa de cualquier especie que exprese la quinasa, opcionalmente AKT humana. El ARNm y las secuencias de proteínas de AKT humano se exponen en los números de acceso de GenBank NM_001014431 y NP_001014431, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "eNOS" se refiere a la óxido nítrico sintetasa de células endoteliales, también conocida como NOS 3, NOS III o ECNOS, una enzima intracelular que es fosforilada tras la activación de Tie2. El término "eNOS" pretende abarcar la enzima de cualquier especie que exprese la enzima, opcionalmente eNOS humano. El ARNm y las secuencias de proteínas de eNOS humana se exponen en los números de acceso de GenBank NM_000603 y NP_000594, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "péptido de unión a Tie2" pretende abarcar péptidos de al menos cuatro aminoácidos de longitud y, opcionalmente, no más de 100 aminoácidos de longitud que tengan afinidad de unión por Tie2. Además, la expresión "péptido de unión a Tie2" pretende abarcar péptidos compuestos en su totalidad o en parte de L-aminoácidos, péptidos compuestos en su totalidad o en parte de D-aminoácidos y péptidos compuestos tanto de L- como de D-aminoácidos. Aún más, la expresión "péptido de unión a Tie2" pretende abarcar péptidos compuestos en su totalidad o en parte de los 20 restos de aminoácidos naturales, péptidos compuestos en su totalidad o en parte de restos de aminoácidos no naturales y péptidos compuestos de restos de aminoácidos tanto naturales como no naturales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "monómero peptídico de unión a Tie2" se pretende que se refiera a una sola unidad de un compuesto peptídico de unión a Tie2. El compuesto peptídico de unión a Tie2, o monómero, comprende el péptido de unión a Tie2, y puede comprender otros restos químicos (p. ej., espaciadores, grupos de multimerización y similares), pero el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende solo una copia (o unidad) del péptido de unión a Tie2 y, por lo tanto, tiene una valencia única para el receptor Tie2.

Como se usa en el presente documento, el término "péptido" también puede referirse a proteínas.

Como se usa en el presente documento, el término "forma multimérica" de un monómero peptídico de unión a Tie2 pretende referirse a formas que contienen más de una unidad del monómero peptídico de unión a Tie2 de manera que la forma multimérica (p. ej., dímero, tetrámero y similares) comprende más de una copia (o unidad) del péptido de unión a Tie2 y, por lo tanto, tiene multivalencia para el receptor Tie2. En una realización particular, la forma multimérica es un tetrámero. Las formas multiméricas de péptidos de unión a Tie2 se han descrito previamente en el documento WO 2008/049227.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alta afinidad", como se usa con respecto a la unión de un péptido de unión a Tie2 al receptor Tie2, se pretende que signifique la unión del péptido al receptor con K_d de aproximadamente 10^{-3} M o menos, 10^{-4} M o menos, o 10^{-5} M o menos.

Como se usa en el presente documento, el término "agonista de Tie2" se refiere a un agente que lleva a cabo la biología consistente con la señalización del receptor Tie2, por ejemplo, un agente que es capaz de estimular, mejorar, aumentar o regular por aumento la actividad y/o estabilidad del receptor Tie2, medido por cualquier método, técnica, señal, detector o indicador que se sabe en la técnica que es indicativo de la biología del receptor Tie2. Los ejemplos no limitantes de indicadores de actividad de Tie2 incluyen la fosforilación de Tie2 humano en el resto de aminoácido Y897, Y992, Y1048, Y1102, Y1108 o Y1113, o en el aminoácido Y1100, Y1106 o Y1106, 1111 del Tie2 de ratón, o la fosforilación de uno o más de MAPK, AKT y eNOS.

Métodos y Usos

Los autores de la presente invención han demostrado que la administración de una forma multimérica de un péptido de unión a Tie2 llamado Vasculotida, puede aumentar la supervivencia en un modelo de ratón de neumonía viral primaria y lesión pulmonar aguda.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método de tratamiento de un animal o célula infectada con gripe que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para tratar un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para tratar un animal o célula infectada con gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para su uso en el tratamiento de un animal o célula infectada con gripe.

La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula infectada con gripe que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula infectada con gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en el aumento de la supervivencia y/o disminución de la mortalidad en un animal o célula infectada con gripe.

Los autores de la presente invención también han mostrado que el virus de la gripe induce fuga endotelial pulmonar, en contraste con el consenso científico tradicional en el que el virus de la gripe afecta solo el epitelio, y que esto es un determinante de la mortalidad por infecciones pulmonares. Los autores de la invención han mostrado además que la Vasculotida reduce la fuga microvascular pulmonar de la gripe o las complicaciones derivadas de la gripe.

Por consiguiente, la presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para disminuir la fuga endotelial en un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para disminuir la fuga endotelial en un animal o célula infectada con gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en la disminución de la fuga endotelial en un animal o célula infectada con gripe.

Como se usa en el presente documento, el término "gripe" se refiere a una enfermedad infecciosa causada por virus ARN de la familia *Orthomyxoviridae*. El término gripe también se refiere a neumonía viral primaria. En una realización, la gripe es una enfermedad causada por un virus de la gripe humana. Los virus de la gripe humana se pueden distinguir de los virus de la gripe aviar (por ejemplo, gripe aviar H5N1) por la falta de ciertos aminoácidos básicos en sus moléculas de hemaglutinina; esto limita la escisión a proteasas similares a tripsina que están contenidas dentro del tracto respiratorio. Por lo tanto, la gripe humana infecta principalmente el epitelio respiratorio, lo que conduce lesión epitelial, apoptosis y descamación (Kuiken y Taubenberger, 2008). En contraste, los virus de

la gripe aviar pueden replicarse fuera del tracto respiratorio y dirigirse a células endoteliales. Los virus de la gripe humana también se pueden distinguir de los virus de la gripe aviar basándose en que los virus de la gripe humana se pueden transmitir de un ser humano a otro, pero los virus de la gripe aviar no se pueden transmitir de un ser humano a otro. Los ejemplos no limitantes de virus de la gripe humana incluyen los siguientes: H1N1, H3N2, H2N2 y H1N2.

Como se usa en el presente documento, la expresión "fuga endotelial pulmonar" se refiere a una pérdida de integridad de la barrera o una mayor permeabilidad del endotelio microvascular pulmonar. La expresión "disminución de la fuga endotelial pulmonar" se refiere a una disminución de la fuga endotelial pulmonar de al menos 5, 10, 15, 25, 50, 75 o 100% en comparación con un control que no se trata mediante los métodos y usos descritos en este documento. En una realización, la fuga endotelial pulmonar se mide por la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) o fluorescencia de un compuesto marcado con fluoresceína tal como dextrano. La expresión "disminución de la fuga endotelial pulmonar" también se refiere a una disminución en la permeabilidad del endotelio microvascular pulmonar de al menos 5, 10, 15, 25, 50, 75 o 100% en comparación con un control que no se trata por los métodos y usos descritos en este documento.

Los autores de la presente invención también han mostrado que la infección en dosis baja con gripe predispone al endotelio pulmonar a una mayor fuga tras la exposición posterior a bacterias, un fenómeno conocido como cebado, y que la Vasculotida es capaz de anular esta fuga inducida por cebado.

Por consiguiente, la presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método de tratamiento de una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite, que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para tratar una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para tratar una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en el tratamiento de una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite.

La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe, que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en el aumento de la supervivencia y/o disminución de la mortalidad en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe.

La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe, que comprende administrar un agonista de Tie2. La descripción también proporciona el uso de un agonista de Tie2 para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. También se proporciona el uso de un agonista de Tie2 en la preparación de un medicamento para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. Además se proporciona un agonista de Tie2 para usar en la disminución de la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula con una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sobreinfección bacteriana" se refiere a una infección bacteriana que surge secundaria o típicamente después de una infección primaria de gripe, que incluye una infección de gripe de dosis baja. Una sobreinfección bacteriana también se puede definir como una neumonía que ocurre simultáneamente con o después de la infección de gripe. En una realización, la bacteria responsable de la sobreinfección bacteriana es una bacteria Gram positiva tal como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) o *Staphylococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). Sin estar limitado por la teoría, se cree que la gripe prepara el endotelio pulmonar, haciéndolo más susceptible a las fugas cuando se produce una infección bacteriana secundaria. Como resultado, las sobreinfecciones bacterianas pueden causar lesiones pulmonares graves después de infecciones por lo demás habituales con la gripe.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una sobreinfección bacteriana asociada con gripe" se refiere en una realización a una sobreinfección bacteriana que ocurre al mismo tiempo, o simultáneamente con, una infección de gripe. En otra realización, la expresión "una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe" se refiere a una sobreinfección bacteriana que se produce posteriormente a, o después de una infección de gripe.

El tratamiento actual con agentes antivirales no es tan efectivo a medida que pasa el tiempo entre el comienzo inicial de la infección y el tratamiento, lo cual es problemático ya que los pacientes no siempre acuden al tratamiento inmediatamente después de que surgen los síntomas. En contraste con la disminución de la eficacia del tratamiento

antiviral, los autores de la presente invención han demostrado que Vasculotida es efectivo incluso si se administra de manera retardada.

5 Por consiguiente, en una realización, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 24 horas después de la infección. En otra realización, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 48 horas después de la infección. En otra realización más, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 72 horas después de la infección.

10 Los autores de la presente invención también han mostrado que el tratamiento con Vasculotida no reduce la eficacia del tratamiento antiviral y la administración de un agonista de Tie2, por ejemplo, Vasculotida, en combinación con un fármaco antiviral puede aumentar la supervivencia en un modelo de ratón de neumonía viral primaria y lesión pulmonar aguda debida a la gripe. Por consiguiente, la presente descripción también proporciona un método para tratar un animal o célula infectada con gripe que comprende administrar (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral al animal o célula que lo necesita. La descripción también proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para tratar un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral en la preparación de un medicamento para tratar un animal o célula infectada con gripe. Además se proporciona (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para usar en el tratamiento de un animal o célula infectada con gripe.

15 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula infectada con gripe, que comprende administrar (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral. La descripción también proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral en la preparación de un medicamento para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal o célula infectada con gripe. Además se proporciona (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para usar en el aumento de la supervivencia y/o disminución de la mortalidad en un animal o célula infectada con gripe.

20 La presente descripción también proporciona un agonista de Tie2 para usar en un método para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe, que comprende administrar (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral. La descripción también proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe. También se proporciona el uso de (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral en la preparación de un medicamento para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe. Además se proporciona (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral para usar en la disminución de la fuga endotelial pulmonar en un animal o célula infectada con gripe.

25 La expresión "agente antiviral" como se usa en el presente documento se refiere a un fármaco usado para tratar infecciones virales tales como infecciones por virus de la gripe. En una realización, un agente antiviral es un agente que suprime la capacidad de reproducción de un virus. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a amantadina, rimantadina, zanamivir, peramivir, viramidina, ribavirina y oseltamivir (también conocido como Tamiflu®).

30 El término "tratar o tratamiento" como se usa en el presente documento significa un planteamiento para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a alivio o mejora de uno o más síntomas o afecciones, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado de la enfermedad (es decir, no empeoramiento), prevención de la propagación de la enfermedad, retraso o desaceleración del avance de la enfermedad, mejoría o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. Como se usa en el presente documento, el término "tratar o tratamiento" también incluye prevenir o retrasar una sobreinfección bacteriana secundaria a infección viral por gripe. Los ejemplos de resultados beneficiosos del tratamiento de la gripe incluyen aumentar la supervivencia, disminuir la mortalidad, disminuir la fuga endotelial pulmonar, disminuir la pérdida de peso y/o prevenir la hipotermia y mejorar la oxigenación arterial.

35 La expresión "aumento de la supervivencia", como se usa en el presente documento, significa aumentar el tiempo que un animal sobrevive después de la infección de gripe y/o sobreinfección bacteriana asociada con la gripe. En una realización, la expresión "aumento de la supervivencia" se refiere al menos a un aumento del 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200% del período de tiempo que un animal sobrevive después de la infección de gripe en comparación con un animal que no se trata con los métodos y usos descritos en este documento.

40 La expresión "disminución de la mortalidad", como se usa en el presente documento, significa disminuir la tasa de mortalidad de un animal o célula con gripe y/o sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en comparación con un animal que no se trata con los métodos y usos descritos en el presente documento. En una realización, la tasa de mortalidad disminuye al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% en comparación con un animal que no se trata con los métodos y usos descritos en este documento.

El término "administración" incluye la administración de los agentes descritos en este documento a un animal o una célula *in vitro* o *in vivo*.

El término "animal" como se usa en el presente documento incluye a todos los miembros del reino animal, incluidos seres humanos.

- 5 El término "célula" incluye una sola célula, así como una pluralidad o población de células. La administración a una célula incluye la administración *in vitro* (o *ex vivo*) así como *in vivo*.

El agonista de Tie2 se puede administrar por cualquier método adecuado, incluyendo por vía tópica, sistémica, oral, intranasal o por inhalación.

- 10 El agente antiviral también se puede administrar de cualquier manera adecuada, incluyendo, sin limitación, por vía tópica, sistémica, oral, intranasal o por inhalación.

- 15 El agonista de Tie2 y el agente antiviral se pueden administrar simultáneamente (al mismo tiempo). En otra realización, el agonista de Tie2 y el agente antiviral también se pueden administrar secuencialmente. El agonista de Tie2 se puede administrar antes que el agente antiviral o el agente antiviral se puede administrar antes que el agonista de Tie2. En una realización, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 24 horas después del agente antiviral. En otra realización, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 48 horas después del agente antiviral. En otra realización más, el agonista de Tie2 se usa o administra aproximadamente o al menos 72 horas después del agente antiviral.

- 20 La administración de una "cantidad efectiva" de los agentes descritos en el presente documento se define como una cantidad efectiva, en dosis y durante los periodos de tiempo necesarios para lograr el resultado deseado. La cantidad efectiva del agente de unión y/o activación de Tie2 puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del animal. La cantidad efectiva del agente antiviral también puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del animal.

- 25 Las pautas posológicas se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. El modo de administración (p. ej., *in vivo* por inyección o aplicación tópica o *ex vivo* en cultivo) también afectará a la pauta posológica.

Los métodos y usos descritos en el presente documento incluyen la administración o el uso del agonista de Tie2 solo o como parte de una composición farmacéutica que comprende el agonista de Tie2.

- 30 En una realización, la composición farmacéutica que comprende el agonista de Tie2 para usar en los métodos y usos del presente documento comprende además un agente antiviral. Opcionalmente, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 35 Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser para uso intralesional, intravenoso, tópico, rectal, parenteral, local, inhalación, intranasal o subcutáneo, intradérmico, intramuscular, intratecal, transperitoneal, oral e intracerebral. La composición puede estar en forma líquida, sólida o semisólida, por ejemplo, píldoras, comprimidos, cremas, cápsulas de gelatina, cápsulas, supositorios, cápsulas de gelatina blanda, geles, membranas, tubos, soluciones o suspensiones.

- 40 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar por métodos conocidos *per se* para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a pacientes, y de tal manera que una cantidad efectiva de la sustancia activa se combine en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, EE.UU. 2003 - 20ª edición) y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicado en 1999.

- 45 Sobre esta base, las composiciones farmacéuticas para usar en los métodos y/o usos descritos en el presente documento incluyen, aunque no exclusivamente, el compuesto o sustancia activa en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmótico con los fluidos fisiológicos. Las composiciones farmacéuticas pueden contener adicionalmente otros agentes tales como corticosteroides y moduladores inmunitarios.

Composiciones que comprenden (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral

- 50 Los autores de la presente invención demostraron que la administración del agonista de Tie2, Vasculotida, en combinación con un fármaco antiviral no reduce la eficacia del fármaco antiviral y puede aumentar la supervivencia en un modelo de ratón de neumonía viral primaria y daño pulmonar agudo debido a la gripe.

Por consiguiente, la descripción proporciona una composición que comprende (a) un agonista de Tie2 como se describe en este documento y (b) un agente antiviral. Opcionalmente, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El agente antiviral es cualquier agente usado para tratar infecciones virales, tales como infecciones por virus de la gripe. En una realización, un agente antiviral es un agente que suprime la capacidad de reproducción de un virus de la gripe. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen, pero no se limitan a amantadina, rimantadina, zanamivir, peramivir, viraamidina, ribavirina y oseltamivir (también conocido como Tamiflu®).

5 Dichas composiciones farmacéuticas pueden ser para uso intralesional, intravenoso, tópico, rectal, parenteral, local, inhalación, intranasal o subcutáneo, intradérmico, intramuscular, intratecal, transperitoneal, oral e intracerebral. La composición puede estar en forma líquida, sólida o semisólida, por ejemplo, píldoras, comprimidos, cremas, cápsulas de gelatina, cápsulas, supositorios, cápsulas de gelatina blanda, geles, membranas, tubos, soluciones o suspensiones.

10 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar por métodos conocidos *per se* para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que se pueden administrar a pacientes, y de tal manera que una cantidad efectiva de la sustancia activa se combine en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, EE.UU. 2003 - 20ª edición) y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicado en 1999.

15 Sobre esta base, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen, aunque no exclusivamente, el compuesto o sustancia activa en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, y contenidos en soluciones tamponadas con un pH adecuado e isoosmótico con los fluidos fisiológicos. Las composiciones farmacéuticas pueden contener adicionalmente otros agentes tales como corticosteroides y moduladores inmunitarios.

La descripción también proporciona un kit que comprende (a) un agonista de Tie2 como se describe en este documento y (b) un agente antiviral como se describe en este documento.

25 En una realización, el kit comprende además un recipiente. En otra realización, el kit contiene instrucciones para el uso del kit para tratar la gripe en un animal o célula que lo necesita y/o para aumentar la supervivencia y/o disminuir la mortalidad en un animal con gripe. En otras realizaciones, el kit contiene instrucciones para el uso del kit para tratar una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe en un animal o célula que lo necesite. En realizaciones adicionales, el kit proporciona instrucciones para el uso del kit para disminuir la fuga endotelial pulmonar en un animal con gripe.

30 El agonista de Tie2 y el agente antiviral del kit son opcionalmente para usar de forma simultánea o secuencial. El agonista de Tie2 se puede usar antes que el agente antiviral o el agente antiviral se puede usar antes que el agonista de Tie2.

Agonistas de Tie2 para usar en los métodos, usos, composiciones y kits descritos en este documento

Angiopoyetina-1

35 El agonista de Tie2 se puede unir y activar el receptor Tie2, es decir, actuar directamente, o puede activar el receptor Tie2 indirectamente. Como tal, otra denominación del agonista de Tie2 es agente de unión y/o activación de Tie2.

En una realización, el agonista de Tie2 comprende una proteína angiopoyetina-1 o una variante de la misma. En una realización, la proteína angiopoyetina-1 comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en NP_001137 o una variante de la misma.

40 En otra realización, el agonista de Tie2 comprende un ácido nucleico que codifica una proteína angiopoyetina-1 o una variante de la misma. En una realización, la molécula de ácido nucleico de la angiopoyetina-1 comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en NM_001146 o una variante de la misma. En otra realización, el agonista de Tie2 comprende el dominio de unión al receptor de la angiopoyetina-1.

45 La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consiste en bases, azúcares y enlaces entre azúcares (cadena principal) de origen natural. Las secuencias de ácido nucleico pueden ser ácidos ribonucleicos (ARN) o desoxirribonucleicos (ADN).

50 El término "variante", como se usa en el presente documento, incluye modificaciones, sustituciones, adiciones, derivados, análogos, fragmentos, versiones químicas o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos de angiopoyetina que realizan sustancialmente la misma función que los péptidos de angiopoyetina descritos en el presente documento sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo, las variantes de los péptidos de angiopoyetina tendrían la misma función de poder unirse y activar Tie2 cuando se presentan como una forma multimérica.

Las variantes también incluyen péptidos con secuencias de aminoácidos que son sustancial o esencialmente idénticas a las secuencias de angiopoyetina.

La expresión "sustancialmente idéntico" o "esencialmente idéntico" como se usa en el presente documento significa una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea de manera óptima, por ejemplo usando los métodos descritos en el presente documento, comparte al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una segunda secuencia de aminoácidos.

- 5 El término "fragmento de angiopoyetina-1" como se usa en el presente documento significa una porción del péptido de angiopoyetina-1 que contiene al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más de la longitud total del polipéptido angiopoyetina-1 que se puede unir y/o activar Tie2 cuando se presenta como una forma multimérica.

- 10 El término "homólogo" significa aquellas secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos que tienen variaciones de secuencia leves o insignificantes de la angiopoyetina-1, es decir, las secuencias funcionan sustancialmente de la misma manera. Las variaciones pueden ser atribuibles a mutaciones locales o modificaciones estructurales. Las secuencias que tienen una homología sustancial incluyen secuencias de ácido nucleico que tienen al menos 65%, al menos 85% o 90-95% de identidad con secuencias de angiopoyetina-1. La identidad de secuencia se puede calcular de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. La identidad de secuencia del ácido nucleico se puede evaluar mediante el algoritmo de búsqueda avanzada BLAST versión 2.1. BLAST es una serie de programas que están disponibles en línea en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. La búsqueda de Blast avanzada (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1>) está configurada con los parámetros predeterminados. (es decir, Matrix BLOSUM62; coste por existencia de hueco 11; coste de hueco por resto 1; relación Lambda 0.85 por defecto) Las referencias a la búsqueda de BLAST son: Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. y Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403410; Gish, W. y States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search." *Nature Genet.* 3:266272; Madden, T.L., Tatusov, R.L. y Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" *Meth. Enzymol.* 266:131_141; Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* 25:33893402; Zhang, J. y Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation." *Genome Res.* 7:649656.

- 30 El término "análogo" significa una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico que se ha modificado en comparación con las secuencias de angiopoyetina-1 en donde la modificación no altera la utilidad de la secuencia (p. ej., como un agente de unión y/o activación de Tie2) como se describe en el presente documento. La secuencia o análogo modificado puede tener propiedades mejoradas frente a las secuencias de angiopoyetina-1. Un ejemplo de una modificación de ácido nucleico para preparar un análogo es sustituir una de las bases naturales (es decir, adenina, guanina, citosina o timidina) de la secuencia por una base modificada tal como xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil , 2-propil y otras alquil-adeninas, 5-halogeno-uracilo, 5-halogeno-citosina, 6-aza-uracilo, 6-aza-citosina y 6-aza-timidina, pseudouracilo, 4-tiouracilo, 8-halogeno-adenina, 8-aminoadenina, 8-tiol-adenina, 8-tiotalquil-adeninas, 8-hidroxil-adenina y otras adeninas 8-sustituidas, 8-halogeno-guaninas, 8-amino-guanina, 8-tiol-guanina, 8-tiotalquil-guaninas, 8-hidroxil-guanina y otras guaninas 8-sustituidas, otros aza- y desaza-uracilos, timidinas, citosinas, adeninas o guaninas, 5-trifluorometil-uracilo y 5-trifluoro-citosina.

- 40 Otro ejemplo de una modificación es incluir heteroátomos de fósforo u oxígeno modificados en la cadena principal de fosfato, enlaces entre azúcares de alquilo de cadena corta o cicloalquilo o enlaces entre azúcares heteroatómico o heterocíclico de cadena corta en las moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico pueden contener fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos y fosforoditioatos.

- 45 Un ejemplo adicional de un análogo de una molécula de ácido nucleico de la descripción es un ácido nucleico peptídico (PNA) en donde la cadena principal de desoxirribosa (o ribosa)-fosfato en el ADN (o ARN), se sustituye por una cadena principal de poliamida que es similar a la encontrada en péptidos (P.E. Nielsen et al. *Science* 1991, 254, 1497). Se ha mostrado que los análogos de PNA son resistentes a la degradación por enzimas y tienen una vida prolongada *in vivo* e *in vitro*. Los PNA también se unen más fuerte a una secuencia de ADN complementaria debido a la falta de repulsión de cargas entre la cadena de PNA y la cadena de ADN. Otros análogos de ácido nucleico pueden contener nucleótidos que contienen cadenas principales de polímeros, cadenas principales cíclicas o cadenas principales acíclicas. Por ejemplo, los nucleótidos pueden tener estructuras de cadena principal de morfolino (Patente de Estados Unidos N° 5 034 506). Los análogos también pueden contener grupos tales como grupos informadores, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas de la secuencia de ácido nucleico.

- 55 La descripción también incluye secuencias que hibridan con las secuencias de angiopoyetina-1 o un fragmento de las mismas y mantienen la propiedad de unirse y activar Tie2 cuando se presenta como una forma multimérica. El término "secuencia que hibrida" significa una secuencia de ácido nucleico que puede hibridar con una secuencia en condiciones de hibridación rigurosas. Los expertos en la técnica conocen "condiciones de hibridación rigurosas" adecuadas que promueven la hibridación de ADN, o pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" como se usa en el presente documento significa que se seleccionan condiciones que promueven la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias en disolución. La hibridación puede ocurrir en toda o una parte de una secuencia de molécula de ácido nucleico. La parte que hibrida tiene al menos un 50% de longitud con respecto a

una de las secuencias de polinucleótidos que codifican un polipéptido. A este respecto, la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico, o híbridos, está determinada por la T_m , que en tampones que contienen sodio es una función de la concentración de iones de sodio, contenido de G/C del ácido nucleico marcado, longitud de la sonda de ácido nucleico (l), y temperatura ($T_m = 81.5^\circ\text{C} - 16.6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\%(\text{G}+\text{C}) - 600/l)$). En consecuencia, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad del híbrido son la concentración de iones de sodio y la temperatura. Con el fin de identificar moléculas que son similares, pero no idénticas, a una molécula de ácido nucleico conocida, se puede suponer que un apareamiento erróneo de 1% da como resultado una disminución de aproximadamente 1°C en la T_m , por ejemplo, si se buscan moléculas de ácido nucleico que tienen una identidad mayor de 95%, el lavado final se reducirá en 5°C . Basándose en estas consideraciones, las condiciones de hibridación rigurosas se definirán como: hibridación en 5 x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC)/5 x solución de Denhardt/SDS al 1.0% a T_m (basado en la ecuación anterior) - 5°C , seguido de un lavado de 0.2 x SSC/SDS al 0.1% a 60°C .

La angiopoyetina-1 se puede modificar para contener sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos que no alteran las propiedades de unión y/o activación de la proteína. Las sustituciones de aminoácidos conservadas implican sustituir uno o más aminoácidos de la proteína por aminoácidos de características de carga, tamaño y/o hidrofobicidad similares. Cuando solo se realizan sustituciones conservadas, el análogo resultante debería ser funcionalmente equivalente a la angiopoyetina-1. Las sustituciones no conservadas implican sustituir uno o más aminoácidos de la proteína conjugada por uno o más aminoácidos que poseen características de carga, tamaño y/o hidrofobicidad diferentes.

La administración o el uso de un ácido nucleico que codifica la angiopoyetina-1 o una variante del mismo incluye la administración o el uso de un vector que contiene la molécula de ácido nucleico y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia insertada.

Las secuencias reguladoras adecuadas pueden derivar de una variedad de fuentes, que incluyen genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamíferos o de insectos (por ejemplo, ver las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). La selección de secuencias reguladoras adecuadas depende de la célula hospedante elegida como se describe a continuación, y la puede realizar fácilmente un experto en la técnica. Los ejemplos de dichas secuencias reguladoras incluyen: un promotor de la transcripción y secuencia potenciadora o de unión a la ARN polimerasa, una secuencia de unión al ribosoma, que incluye una señal de inicio de traducción. Además, dependiendo de la célula hospedante elegida y el vector empleado, se pueden incorporar al vector de expresión otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de transcripción. También se apreciará que las secuencias reguladoras necesarias pueden ser suministradas por las secuencias de angiopoyetina-1 y/o sus regiones flanqueadoras.

Los vectores de expresión recombinantes utilizados en los métodos y usos descritos en el presente documento también pueden contener un gen marcador seleccionable que facilita la selección de células hospedantes transformadas o transfectadas con una molécula recombinante descrita en el presente documento. Ejemplos de genes marcadores seleccionables son los genes que codifican una proteína como G418 y la higromicina que confieren resistencia a ciertos fármacos, β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga o una inmunoglobulina o una parte de la misma, tal como la parte Fc de una inmunoglobulina, opcionalmente la IgG. La transcripción del gen marcador seleccionable se controla mediante cambios en la concentración de la proteína marcadora seleccionable tal como β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador seleccionable codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos como la resistencia a la neomicina, las células transformantes se pueden seleccionar con G418. Las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán mientras que las otras células mueren. Esto permite visualizar y analizar la expresión de vectores de expresión recombinantes y, en particular, determinar el efecto de una mutación en la expresión y el fenotipo. Se apreciará que los marcadores seleccionables se pueden introducir en un vector separado del ácido nucleico de interés.

Los vectores de expresión recombinantes se pueden introducir en células hospedantes para producir una célula hospedante transformada. La expresión "célula hospedante transformada" pretende incluir células que se pueden transformar o transfectar con un vector de expresión recombinante de la descripción. Los términos "transducido", "transformado con", "transfectado con", "transformación" y "transfección" pretenden abarcar la introducción de ácido nucleico (p. ej., un vector o ARN o ADN desnudo) en una célula mediante una de muchas técnicas posibles conocidas en la técnica. Las células procariotas se pueden transformar con ácido nucleico mediante, por ejemplo, electroporación o transformación mediada por cloruro de calcio. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede introducir en las células de mamíferos mediante técnicas convencionales tales como la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación, microinyección, transferencia de ARN, transferencia de ADN, cromosomas artificiales, vectores virales y cualquier tecnología emergente de transferencia de genes. Se pueden encontrar métodos adecuados para transformar y transfectar células hospedantes en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)) y otros libros de texto de laboratorio.

Las células hospedantes adecuadas incluyen una amplia variedad de células hospedantes eucariotas y células procariotas. Por ejemplo, las proteínas se pueden expresar en células de levadura o células de mamífero. Se pueden encontrar otras células hospedantes adecuadas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991). Además, las proteínas de la descripción se pueden expresar en células procariotas, tales como *Escherichia coli* (Zhang et al., *Science* 303 (5656): 371-3 (2004)).

Las células de mamífero adecuadas incluyen, entre otras: células 293T, COS (p. ej., ATCC N° CRL 1650 o 1651), BHK (p. ej. ATCC N° CRL 6281), CHO (ATCC N° CCL 61), HeLa (p. ej., ATCC N° CCL 2), 293 (ATCC N° 1573) y células NS-1.

Los vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión en células de mamífero generalmente incluyen un promotor (p. ej., derivado de material viral tal como poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40), así como otras secuencias de control transcripcionales y traduccionales. Los ejemplos de vectores de expresión en mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, B., *Nature* 329: 840 (1987)), pMT2PC (Kaufman et al., *EMBO J.* 6: 187-195 (1987)) y pCMV (Clontech, California, EE.UU.).

Inhibidores de la angiopoyetina-2

En otra realización, el agente activador de Tie2, es decir, el agonista de Tie2, comprende un inhibidor de la angiopoyetina-2.

Un "inhibidor de la angiopoyetina-2" como se usa en el presente documento incluye cualquier sustancia que sea capaz de inhibir la expresión o actividad de la angiopoyetina-2 y, por lo tanto, incluye sustancias que inhiben la angiopoyetina-2 o la interacción de la angiopoyetina-2 con el receptor Tie2. Dichos inhibidores incluyen opcionalmente moléculas de ácido nucleico antiparalelo, ARNip, proteínas, anticuerpos (y fragmentos de los mismos), aptámeros, peptidocuerpos, inhibidores moléculas pequeñas y otras sustancias. En una realización, el inhibidor es un anticuerpo bloqueante o fragmento del mismo contra la angiopoyetina-2. En otra realización, el inhibidor es un peptidocuerpo contra la angiopoyetina-2. En una realización, la angiopoyetina-2 tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en NP_001138. En otra realización, el inhibidor es un ácido nucleico antiparalelo o un ARNip contra una molécula de ácido nucleico de angiopoyetina-2. En una realización, la molécula de ácido nucleico de angiopoyetina-2 tiene la secuencia de ácido nucleico como se muestra en NM_001147.

La expresión "ácido nucleico antiparalelo" como se usa en el presente documento significa un ácido nucleico que se produce a partir de una secuencia que se invierte en relación con su presentación normal para la transcripción. Las moléculas de ácido nucleico antiparalelo se pueden sintetizar químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados de forma variada diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado con ARNm o el gen natural, p. ej., derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Las secuencias antiparalelas se pueden producir biológicamente usando un vector de expresión introducido en las células en forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que las secuencias antiparalelas se producen bajo el control de una región reguladora de alta eficiencia, cuya actividad se puede determinar por el tipo de célula en la que se introduce el vector.

El término "ARNip" se refiere a un ARN inhibidor corto que se puede usar para silenciar la expresión génica de un gen específico. El ARNip puede ser un ARN en horquilla corta (p. ej., ARNhc) que activa una ruta de degradación celular dirigida a los ARNm correspondientes al ARNip. Los métodos para diseñar moléculas específicas de ARNip y administrarlas son conocidas por un experto en la técnica. Se sabe en la técnica que se obtiene un silenciamiento eficiente con complejos dúplex de ARNip emparejados para tener un segmento protuberante 3' de dos nucleótidos. Se cree que la adición de dos nucleótidos de timidina añade resistencia a la nucleasa. Un experto en la materia reconocerá que también se pueden añadir otros nucleótidos.

El término "aptámero", como se usa en el presente documento, se refiere a cadenas cortas de ácidos nucleicos que pueden adoptar conformaciones tridimensionales altamente específicas. Los aptámeros pueden presentar una alta afinidad y especificidad de unión a una molécula objetivo. Estas propiedades permiten que dichas moléculas inhiban específicamente la actividad funcional de las proteínas. Por lo tanto, en otra realización, el inhibidor de Ang2 es un aptámero que se une e inhibe la actividad de la Ang2.

El término "peptidocuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína recombinante que fusiona una región peptídica con la región Fc de la IgG. Por lo tanto, en otra realización, el inhibidor de Ang2 es un inhibidor peptídico de Ang2 fusionado con la región Fc de la IgG.

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producirse en animales transgénicos. La expresión "fragmento de anticuerpo" como se usa en el presente documento pretende incluir, sin limitaciones, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos y anticuerpos de dominios. Los anticuerpos se pueden fragmentar utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, se pueden generar fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. Fab, Fab' y

F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también se pueden sintetizar mediante técnicas recombinantes.

Se pueden usar métodos convencionales para preparar anticuerpos. Por ejemplo, usando un péptido de angiopoyetina o Tie2, se pueden hacer antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales usando métodos convencionales. Un mamífero (p. ej., un ratón, hámster o conejo) se puede inmunizar con una forma inmunogénica del péptido que provoca una respuesta de anticuerpos en el mamífero. Las técnicas para conferir inmunogenicidad a un péptido incluyen la conjugación con vehículos u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, el péptido se puede administrar en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización se puede seguir mediante la detección de títulos de anticuerpos en el plasma o suero. Se puede usar ELISA estándar u otros procedimientos de inmunoanálisis con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. Después de la inmunización, se pueden obtener antisueros y, si se desea, anticuerpos policlonales aislados de los sueros.

Para producir anticuerpos monoclonales, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) se pueden recoger de un animal inmunizado y fusionar con células de mieloma mediante procedimientos estándar de fusión de células somáticas, inmortalizando así estas células y produciendo células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica (p. ej., la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (*Nature* 256: 495-497, 1975), así como otras técnicas tales como la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor y Roder, *Immunology Today* 4: 3, 72-79, 1983), la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., "The EBV-Hybridoma Technique and its Application to Human Lung Cancer" en "Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy", Allen R. Bliss, Inc. (1985), páginas 77-96) y selección de bibliotecas de anticuerpos combinatorias (Huse et al. *Science* 246: 4935, 1275-1282, 1989). Las células de hibridoma se pueden seleccionar de forma inmunológica para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con el péptido y los anticuerpos monoclonales pueden aislarse. Por lo tanto, la descripción también contempla células de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales con especificidad por angiopoyetina-2 o Tie2.

También se contemplan derivados de anticuerpos quiméricos, es decir, moléculas de anticuerpos que combinan una región variable animal no humana y una región constante humana. Las moléculas de anticuerpos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata u otra especie, con regiones constantes humanas. Se pueden usar métodos convencionales para hacer anticuerpos quiméricos que contienen la región variable de inmunoglobulina que reconoce la proteína angiopoyetina-2 o Tie2 (véase, por ejemplo, Morrison et al. (PNAS 81:21, 6851-6855, 1984) y Takeda et al. (*Nature* 314: 452-454), y las patentes de Cabilly et al., Patente de EE.UU. N° 4 816 567; Boss et al., Patente de EE.UU. N° 4 816 397; Tanaguchi et al., Publicación de Patente Europea N° EP171496; Publicación de Patente Europea N° 0173494, patente del Reino Unido GB 2177096B).

Los anticuerpos monoclonales o quiméricos que reaccionan específicamente con angiopoyetina-2 o Tie2 como se describe en el presente documento se pueden humanizar adicionalmente produciendo quimeras de región constante humana, en las que partes de las regiones variables, en particular las regiones armazón conservadas del dominio de unión al antígeno, son de origen humano y solo las regiones hipervariables son de origen no humano. Dichas moléculas de inmunoglobulina se pueden hacer mediante técnicas conocidas en la técnica (p. ej., Teng et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:12, 7308-7312), Kozbor y Roder (1983) *Immunology Today* 4: 3, 72-79; Olsson et al. (1982) *Métodos en Enzymol.* 92, 3-16, Publicación de Solicitud de Patente PCT N° WO92/06193 y Publicación de Solicitud de Patente EP N° 0 239 400). Los anticuerpos humanizados también se pueden producir comercialmente (Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña).

Los anticuerpos específicos, o fragmentos de anticuerpos, reactivos contra la angiopoyetina-2 o Tie2 también se pueden generar mediante el cribado de bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o partes de los mismos, expresados en bacterias con péptidos producidos a partir de las moléculas de ácido nucleico que codifican una angiopoyetina-2 o Tie2. Por ejemplo, los fragmentos Fab completos, las regiones VH y las regiones FV se pueden expresar en bacterias usando bibliotecas de expresión en fagos (véase, por ejemplo, Ward et al. (1989) *Nature* 348: 544-546, Huse et al. (1989) *Science* 246: 4935, 1275-1282, y McCafferty et al. (1989) *Nature* 348, 552-555).

Los anticuerpos también se pueden preparar usando inmunización con ADN. Por ejemplo, se puede inyectar un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la angiopoyetina-2 en un animal adecuado tal como el ratón. Por lo tanto, la proteína será expresada *in vivo* y se inducirán anticuerpos. Los anticuerpos se pueden aislar y preparar como se ha descrito antes para la inmunización con proteínas.

Los inhibidores de angiopoyetina-2, los péptidos de angiopoyetina-1 o los péptidos de unión a Tie2 descritos en el presente documento también pueden contener o se pueden usar para obtener o diseñar "peptidomiméticos". Por ejemplo, se puede hacer un peptidomimético para imitar la función de un inhibidor de la angiopoyetina-2. Los "peptidomiméticos" son estructuras que sirven como sustitutos de los péptidos en las interacciones entre moléculas (véase Morgan et al. (1989), *Ann. Reports Med. Chem.* 24, 243-252 para una revisión). Los peptidomiméticos incluyen estructuras sintéticas que pueden o no contener aminoácidos y/o enlaces peptídicos, pero conservan las características estructurales y funcionales de la proteína, incluida la unión y/o activación de Tie2. Los peptidomiméticos también incluyen peptoides, oligopeptoides (Simon et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 9367-9371).

Los peptidomiméticos se pueden diseñar basándose en la información obtenida mediante el reemplazo sistemático de L-aminoácidos por D-aminoácidos, el reemplazo de cadenas laterales con grupos que tienen diferentes propiedades electrónicas, y mediante el reemplazo sistemático de enlaces peptídicos con reemplazos de enlaces amida. También se pueden introducir restricciones conformacionales locales para determinar los requisitos conformacionales para la actividad de un peptidomimético candidato. Los miméticos pueden incluir enlaces amida isostéricos o D-aminoácidos para estabilizar o promover conformaciones de giro inverso y para ayudar a estabilizar la molécula. Los análogos de aminoácidos cíclicos se pueden usar para restringir los restos de aminoácidos a estados conformacionales particulares. Los miméticos también pueden incluir imitaciones de las estructuras secundarias de las proteínas descritas en el presente documento. Estas estructuras pueden modelar la orientación tridimensional de los restos de aminoácidos en las conformaciones secundarias conocidas de proteínas. También se pueden usar peptoides que son oligómeros de aminoácidos N-sustituídos y se pueden usar como motivos para la generación de bibliotecas químicamente diversas de moléculas nuevas.

Monómeros peptídicos de unión a Tie2 y formas multiméricas

En otra realización, el agonista de Tie2 es un agente de unión y/o activación para usar en los métodos y usos descritos en el presente documento y comprende una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie2 del mismo.

En una realización, la forma multimérica comprende un número par de unidades del monómero. En otra realización, la forma multimérica es un tetrámero. En otra realización más, la forma multimérica es un dímero. En otras realizaciones más, la forma multimérica comprende seis, ocho, diez o doce unidades del monómero peptídico de unión a Tie2. Los multímeros de orden superior pueden ser, por ejemplo, copias múltiples de un multímero de orden inferior unidas entre sí. Por ejemplo, un octámero podría ser dos tetrámeros unidos entre sí. En otra realización, la forma multimérica comprende un número impar de unidades del monómero. Por ejemplo, la forma multimérica puede ser un trímero o la forma multimérica puede comprender cinco, siete, nueve u once unidades del monómero peptídico de unión a Tie2. En una realización particular, la forma multimérica es un tetrámero.

El péptido de unión a Tie2 contenido dentro del monómero tiene al menos dos aminoácidos de longitud, tiene al menos cinco aminoácidos de longitud o tiene al menos siete aminoácidos de longitud. Un intervalo de tamaño opcional para el péptido es 7-25 aminoácidos de longitud, o 7-15 aminoácidos de longitud. Otros intervalos de tamaño incluyen 5-30 aminoácidos de longitud, 5-40 aminoácidos de longitud, 5-50 aminoácidos de longitud, 5-60 aminoácidos de longitud, 5-70 aminoácidos de longitud, 5-80 aminoácidos de longitud, 5-90 aminoácidos de longitud o 5-100 aminoácidos de longitud. Opcionalmente, el péptido no tiene más de 100 aminoácidos de longitud.

En una realización, el péptido de unión a Tie2 dentro del monómero comprende una secuencia de aminoácidos que está presente en un ligando de Tie2 natural (p. ej., una angiopoyetina, tal como Ang 1 o Ang 2). Por ejemplo, un fragmento de una angiopoyetina que retiene la capacidad de unirse a Tie2 se puede usar como el péptido de unión a Tie2, tal como el dominio similar al fibrinógeno (FLD), también llamado dominio de unión al receptor. Alternativamente, en otra realización, el péptido de unión a Tie2 dentro del monómero comprende una secuencia de aminoácidos que no está presente en un ligando de Tie2 natural. Se ha mostrado que se pueden seleccionar péptidos que tienen secuencias de aminoácidos que difieren de la secuencia primaria de angiopoyetinas que tienen afinidad por Tie2 (véase, p. ej., Tournaire, R. et al. (2004) *EMBO Reports* 5, 262-267). Dichos péptidos se pueden identificar, por ejemplo, mediante cribado de una biblioteca de péptidos presentada en fagos (p. ej., una biblioteca aleatoria de heptámeros) de péptidos que se unen a Tie2 (p. ej., una proteína de fusión Tie2-Fc), con confirmación de péptido unión a Tie2 mediante cribado del péptido seleccionado para la unión a Tie2 usando un ensayo ELISA (p. ej., como se describe en Tournaire, R. et al. (2004) véase antes).

En una realización, el péptido de unión a Tie2 usado en el monómero se une a Tie2 con alta afinidad pero no inhibe sustancialmente la unión de una angiopoyetina a Tie2. En dicha realización, la forma multimérica no compite con las angiopoyetinas naturales por la unión a Tie2. Por ejemplo, el péptido de unión a Tie2 se une a Tie2 con alta afinidad pero no inhibe sustancialmente la unión de Ang 1 a Tie2. Además o alternativamente, el péptido de unión a Tie2 se une a Tie2 con alta afinidad pero no inhibe sustancialmente la unión de, por ejemplo, la Ang 2 o Ang 4 a Tie2.

En una realización, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido T7. En una realización, el péptido T7 comprende una secuencia de aminoácidos: His-His-His-Arg-His-Ser-Phe (SEQ ID NO: 1). En otra realización, el péptido T7 se modifica para tener añadido en el mismo un resto de cisteína amino terminal y, por lo tanto, en esta realización, el péptido T7 comprende una secuencia de aminoácidos: Cys-His-His-His-His-His-Arg-His-Ser-Phe (SEQ ID NO: 2).

En otra realización, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido GA3. En una realización, el péptido GA3 comprende una secuencia de aminoácidos: Trp-Thr-Ile-Ile-Gln-Arg-Arg-Glu-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Phe-Gln-Arg-Thr-Trp-Lys-Glu-Tyr-Lys (SEQ ID NO: 3). En otra realización, el péptido GA3 se modifica para tener añadido en el mismo un resto de cisteína amino terminal y, por lo tanto, en esta realización, el péptido GA3 comprende una secuencia de aminoácidos: Cys-Trp-Thr-Ile-Ile-Gln-Arg-Arg-Glu-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Phe-Gln-Arg-Thr-Trp-Lys-Glu-Tyr-Lys (SEQ ID NO: 4).

En otra realización más, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido T8. En una realización, el péptido T8 comprende una secuencia de aminoácidos: His-Pro-Trp-Leu-Thr-Arg-His (SEQ ID NO: 5). En otra realización, el péptido T8 se modifica para tener añadido en el mismo un resto de cisteína amino terminal y, por lo tanto, en esta realización, el péptido T8 comprende una secuencia de aminoácidos: Cys-His-Pro-Trp-Leu-Thr-Arg-His (SEQ ID NO: 6).

En otra realización más, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido T6. En una realización, el péptido T6 comprende una secuencia de aminoácidos: Lys-Leu-Trp-Val-Ile-Pro-Lys (SEQ ID NO: 7). En otra realización, el péptido T6 se modifica para tener añadido en el mismo un resto de cisteína amino terminal y, por lo tanto, en esta realización, el péptido T6 comprende una secuencia de aminoácidos: Cys-Lys-Leu-Trp-Val-Ile-Pro-Lys (SEQ ID NO: 8).

En otra realización, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido T4. En una realización, el péptido T4 comprende una secuencia de aminoácidos: Asn-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Ser (SEQ ID NO: 9). En otra realización, el péptido T4 tiene un resto de cisteína amino terminal añadido al mismo y, por lo tanto, en esta realización, el péptido T4 comprende una secuencia de aminoácidos: Cys-Asn-Leu-Leu-Met-Ala-Ala-Ser (SEQ ID NO: 10).

Los péptidos de unión a Tie2 T4, T6, T7 y T8 también se describen en Tournaire, R. et al. (2004) *EMBO Reports* 5, 262-267. El péptido de unión Tie2 GA3 también se describe en Wu, X. et al. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315, 1004-1010.

Los péptidos de unión a Tie2 descritos en este documento se pueden modificar para contener sustituciones, inserciones y/o eliminaciones de aminoácidos que no alteran la capacidad de los péptidos para unirse y/o activar Tie2. Las sustituciones de aminoácidos conservadas implican reemplazar uno o más aminoácidos del péptido por aminoácidos de características similares de carga, tamaño y/o hidrofobicidad. Cuando solo se realizan sustituciones conservadas, el análogo resultante debe ser funcionalmente equivalente al péptido. Las sustituciones no conservadas implican reemplazar uno o más aminoácidos del péptido por uno o más aminoácidos que poseen características de carga, tamaño y/o hidrofobicidad diferentes.

Los péptidos de unión a Tie2 descritos en el presente documento se pueden modificar para hacerlos terapéuticamente más efectivos o adecuados. Por ejemplo, los péptidos se pueden convertir en sales farmacéuticas por reacción con ácidos inorgánicos que incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, etc., o ácidos orgánicos que incluyen ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido bencenosulfónico y ácidos toluenosulfónicos.

Además del péptido de unión a Tie2, el monómero peptídico de unión a Tie2 puede comprender otros restos o grupos químicos, tales como espaciadores y/o grupos de multimerización. Por ejemplo, el péptido de unión Tie2 puede estar unido a un espaciador, que puede tener una o más funcionalidades. El espaciador puede, por ejemplo, tener la función de aumentar la distancia entre los monómeros cuando se multimerizan para facilitar la interacción de la forma multimérica con el receptor Tie2 (p. ej., reducir el impedimento estérico). Adicional o alternativamente, el espaciador puede, por ejemplo, servir como un grupo químico por el cual los monómeros se pueden multimerizar y/o pueden contribuir a la farmacodinámica/farmacocinética del compuesto. Además, el monómero peptídico de unión a Tie2 puede comprender uno o más grupos de multimerización, restos químicos que funcionan para facilitar la multimerización de los monómeros. Un grupo de multimerización particular es un grupo biotina, que tiene afinidad por la avidina, estreptavidina y neutravidina de manera que cualquiera de estos tres últimos compuestos se puede usar para la multimerización de monómeros que comprenden un grupo de biotina. Otro ejemplo de un grupo de multimerización es un dominio superenrollado, que se puede unir al extremo amino del péptido mediante técnicas estándar de ingeniería de ADN recombinante y que se autoensambla en estructuras oligoméricas (véanse, p. ej., las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2003/0220476 y 2006/0074230 para una descripción más detallada del uso de dominios superenrollados para la multimerización). Ejemplos no limitantes de dominios superenrollados adecuados para su uso son los dominios superenrollados del factor de transcripción de levaduras GCN4, de la proteína de la matriz del cartílago (CMP) o de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP). Davis et al. proporcionan agentes de multimerización adicionales que usan dominios Fc fusionados que dan como resultado una configuración tetramérica (2003) (véase en particular la Figura 1 de Davis et al.).

En una realización, el espaciador es un espaciador de polietilenglicol (PEG), que es una molécula polimérica que puede contener diferentes números de unidades, tales como 2, 4, 6, 8, 10, 11 o 12 unidades. Los polímeros de PEG también se conocen en la técnica como polímeros de poli(óxido de etileno) (PEO) y, por lo tanto, los términos PEG y PEO como se usan en el presente documento se pretende que sean equivalentes. Numerosos otros espaciadores adecuados (también conocidos como conectores) son bien conocidos en la técnica, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen otros polialquilenglicoles, poliésteres y polialquilenaminas. Además, una amplia variedad de espaciadores unidos en un extremo a un resto reactivo y en el otro extremo a un grupo biotina están disponibles comercialmente (reactivos EZ-Link Biotina disponibles en Pierce Chemical Co., Rockford, IL, EE.UU.) y se pueden usar en la preparación de los monómeros peptídicos de unión a Tie2 usados con los métodos y usos descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de reactivos disponibles comercialmente de la estructura: resto reactivo-espaciador-biotina incluyen:

Reaccionantes reactivos con sulfhidrido:

EZ-Link Biotina-BMCC (1-Biotinamido-4-(4'-[maleimidoetil-ciclohexano]-carboxamido)butano)

EZ-Link Biotina-HPDP (N-(6-(Biotinamido)hexil)-3'-(2'-piridilditio)-propionamida

EZ-Link Yodoacetil-LC-Biotina (N-yodoacetil-N-biotinilhexilendiamina)

5 EZ-Link Yodoacetil-PEO₂ Biotina ((+)-Biotinil-yodoacetamidil-3,6-dioxaoctanodiamina)

EZ-Link Maleimida PEO_n-Biotina (n = 2 u 11)

Reaccionantes reactivos con amina:

EZ-Link NHS-PEO_n-Biotina (n = 4 o 12)

EZ-Link NHS-SS-Biotina (2-(biotinamido)-etil-1,3'-ditiopropionato de succinimidilo)

10 EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotina (6-(biotinamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo) EZ-Link TFP-PEO₃-Biotina (Éster de tetrafluorofenilo PEO₃-biotina)

Reaccionantes reactivos con carboxilo:

EZ-Link 5-(Biotinamido)pentilamina

EZ-Link Reactivo de marcaje Amina-PEO₂-Biotina ((+)-Biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina)

15 EZ-Link Reactivo de marcaje Amina-PEO₃-Biotina ((+)-Biotinil-3,6,9-trioxaundecanodiamina)

EZ-Link Biotina PEO-Amina ((+)-Biotinil-3,6-dioxaoctanodiamina)

EZ-Link Biotina-PEO-LC-Amina ((+)-Biotinil-3,6,9-trioxaundecanodiamina)

20 Además, un espaciador de brazo ramificado se puede unir a múltiples copias del péptido de unión a Tie2 como un medio para multimerizar el péptido. Los ejemplos no limitantes incluyen espaciadores de PEG ramificados activados de 2 y 4 brazos, aunque también se pueden usar espaciadores con más brazos, tales como espaciadores de PEG ramificados activados de 8 o 12 brazos. Los espaciadores de PEG activados ramificados (p. ej., activados con maleimida) están disponibles en el mercado (p. ej., NOF Corporation, Tokio, Japón).

25 En una realización, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende una estructura: A-B-C, en donde A comprende un péptido de unión a Tie2, B comprende un espaciador y C comprende un grupo de multimerización, en donde C tiene afinidad por D, un agente multimérico que comprende múltiples sitios de unión para C. En una realización, el agente multimérico D tiene cuatro sitios de unión para el grupo C de multimerización de manera que se forma un tetrámero cuando cuatro monómeros peptídicos de unión a Tie2, A-B-C, interaccionan con el agente multimérico D. En una realización, el grupo de multimerización, C, para usar en la creación de tetrámeros es un grupo biotina. Los agentes multiméricos opcionales, D, para usar en la creación de tetrámeros son avidina, estreptavidina y neutravidina. Es bien conocido en la técnica que la avidina, la estreptavidina y la neutravidina tienen cuatro sitios de unión para la biotina y que la biotina se une con alta afinidad a cada uno de avidina, estreptavidina y neutravidina. Un espaciador opcional, B, para usar en un monómero de la estructura A-B-C es un espaciador de polietilenglicol (PEG).

35 En otra realización adicional, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende una estructura: A-B, en donde A comprende un péptido de unión a Tie2 y B comprende un espaciador, en donde la forma multimérica se crea por enlace covalente de múltiples péptidos de unión a Tie2 a través del espaciador común B. Un espaciador opcional, B, para usar en el monómero de la estructura A-B es un espaciador de polietilenglicol (PEG).

En otra realización más, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende una estructura: A-B-C, en donde:

A comprende un péptido de unión a Tie2 seleccionado de un péptido T7 y un péptido GA3;

40 B comprende un espaciador de polietilenglicol; y

C comprende un grupo biotina,

45 en donde cuatro copias de A-B-C están asociadas con un agente tetrámero, D, para crear la forma de tetrámero, seleccionándose el agente tetrámero, D, del grupo que consiste en avidina, estreptavidina y neutravidina. Un ejemplo específico de esta realización es un compuesto en el que A comprende un péptido T7, B comprende un espaciador de polietilenglicol y C comprende un grupo biotina, y en donde el agente tetrámero D comprende avidina.

En otra realización más, el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende una estructura A-B-C, en donde:

A comprende un péptido de unión a Tie2;

B comprende un espaciador; y

C comprende un grupo de multimerización.

5 Opcionalmente, el péptido de unión a Tie2, A, comprende un péptido T7 o un péptido GA3. Alternativamente, el péptido de unión a Tie2 puede comprender, por ejemplo, un péptido T8, un péptido T6 o un péptido T4. En una realización, el espaciador, B, comprende un espaciador de polietilenglicol. En otra realización, el grupo de multimerización, C, comprende un grupo biotina.

10 En otra realización adicional, la forma multimérica para usar en los métodos y usos descritos en el presente documento comprende un dímero peptídico, que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; y (c) un resto de conexión que conecta dichas cadenas peptídicas primera y segunda, en donde dicho dímero peptídico se une y activa el receptor Tie2. Opcionalmente, la primera cadena peptídica es un péptido T7 y/o la segunda cadena peptídica es un péptido T7. En una realización, las cadenas peptídicas primera y segunda son péptidos T7. Alternativamente, las cadenas peptídicas primera y segunda se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en un péptido T7, un péptido GA3, un péptido T4, un péptido T6 y un péptido T8. En una realización, las cadenas peptídicas primera y segunda son ambas el mismo tipo de cadena peptídica. Los péptidos de unión a Tie2 adicionales que se pueden usar se han descrito con más detalle anteriormente.

20 Opcionalmente, el resto de conexión comprende uno o más polímeros solubles en agua unidos covalentemente a la primera cadena peptídica y la segunda cadena peptídica. En una realización, el uno o más polímeros solubles en agua son polímeros lineales. Opcionalmente, el polímero soluble en agua es un polietilenglicol (PEG) (p. ej., una molécula lineal de PEG). El PEG puede tener un peso molecular de menos de aproximadamente 50 000 Daltons. En una realización, el PEG lineal tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3 000 Daltons a aproximadamente 20 000 Daltons. En diversas realizaciones, el PEG lineal tiene un peso molecular de aproximadamente 3 000 Daltons, aproximadamente 3 400 Daltons, aproximadamente 5 000 Daltons o aproximadamente 10 000 Daltons. Se entiende que en una preparación dada de PEG, los pesos moleculares variarán típicamente entre las moléculas individuales. Algunas moléculas pesarán más y otras menos que el peso molecular establecido. Dicha variación generalmente se refleja mediante el uso de la palabra "aproximadamente" para describir los pesos moleculares de las moléculas de PEG.

30 En otra realización, la forma multimérica comprende dímeros que utilizan un conector de PEG lineal que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 20 000 Da, o que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3 000 Daltons a aproximadamente 10 000 Da.

35 En otra realización, la forma multimérica comprende un tetrámero peptídico, que comprende: (a) una primera cadena de péptido; (b) una segunda cadena de péptido; (c) una tercera cadena de péptido; (d) una cuarta cadena de péptido; y (e) un resto de conexión que conecta dichas cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta, en donde dicho tetrámero peptídico se une y activa el receptor Tie2. En una realización, la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas son péptidos T7. Alternativamente, las cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en un péptido T7, un péptido GA3, un péptido T4, un péptido T6 y un péptido T8, y opcionalmente la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas son todas el mismo tipo de cadena peptídica. Los péptidos de unión a Tie2 adicionales que se pueden usar se han descrito con más detalle anteriormente.

40 En dicha realización, el resto de conexión comprende uno o más polímeros solubles en agua unidos covalentemente a la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas. En una realización, el uno o más polímeros solubles en agua son polímeros de cadena ramificada, tales como un polietilenglicol (PEG) (p. ej., una molécula de PEG de cadena ramificada). Opcionalmente, el PEG ramificado tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 3 000 Daltons a aproximadamente 50 000 Daltons. En diversas realizaciones, el PEG ramificado tiene un peso molecular de aproximadamente 3 000 Daltons, aproximadamente 3 400 Daltons, aproximadamente 5 000 Daltons, aproximadamente 10 000 Daltons, aproximadamente 20 000 Daltons, aproximadamente 25 000 Daltons, aproximadamente 30 000 Daltons o aproximadamente 40 000 Daltons. Se entiende que en una preparación dada de PEG, los pesos moleculares variarán típicamente entre las moléculas individuales. Algunas moléculas pesarán más y otras menos que el peso molecular establecido. Dicha variación generalmente se refleja mediante el uso de la palabra "aproximadamente" para describir los pesos moleculares de las moléculas de PEG. En el caso de un PEG de 20 kDa para un tetrámero, la longitud del brazo sería de 5 kDa.

55 En los dímeros que contienen PEG, un solo resto de PEG opcionalmente lineal, se une simultáneamente a los extremos (p. ej., los extremos N) de ambas cadenas peptídicas del dímero peptídico. En los tetrámeros que contienen PEG, un solo resto de PEG de cadena ramificada se une simultáneamente a los extremos de las cuatro cadenas peptídicas del tetrámero peptídico. Para preparar los compuestos diméricos y tetraméricos que contienen PEG descritos anteriormente, los péptidos de unión a Tie2 se pueden hacer reaccionar con conectores de PEG activados (p. ej., PEG-dimaleimida para la preparación de dímeros, PEG-tetramaleimida para la preparación de

tetrámero. Dichos conectores de PEG activados (cadena lineal o ramificada) están disponibles en el mercado (p. ej., en NOF America Corporation).

5 Además de los dímeros y tetrámeros descritos anteriormente, se pueden usar otras formas multiméricas que comprenden dos o más péptidos de unión a Tie2 conectados por un resto de conexión, tales como los que contienen tres, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce péptidos de unión a Tie2 unidos covalentemente a un resto de conexión, opcionalmente un resto de conexión ramificado, tal como una molécula de PEG de cadena ramificada. Dichas formas multiméricas alternativas se pueden preparar como se describe para los dímeros y tetrámeros, utilizando restos conectores que tienen el número adecuado de extremos reactivos (p. ej., seis extremos reactivos para un multímero que contiene seis cadenas peptídicas) y la proporción adecuada de péptido a conector (p. ej., 6:1 para un multímero que contiene seis cadenas peptídicas). En dichos casos, se usan moléculas de PEG más grandes para mantener una longitud de brazo similar entre los monómeros. Por ejemplo, un multímero de 8 monómeros hecho con una molécula de PEG de 40 kDa tendría una longitud de brazo de 5 kDa.

10 Los conectores poliméricos solubles en agua alternativos incluyen, pero no se limitan a, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (ya sea homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de poli(óxido de propileno/óxido de etileno) y polioles polioxiethylados. Para dímeros peptídicos, el conector polimérico puede tener un peso molecular de menos de 20 000 Da. En una realización, el peso molecular es de aproximadamente 10 000 Da. Para los tetrámeros peptídicos, el conector polimérico tiene un peso molecular de aproximadamente 20 000 Da.

15 Se pueden usar otros tipos de restos de conexión conocidos en la técnica para unir las cadenas peptídicas en los multímeros (p. ej., dos cadenas peptídicas en el dímero, cuatro cadenas peptídicas en el tetrámero). Los ejemplos no limitantes de restos conectores adecuados adicionales que se pueden usar para unir múltiples cadenas de péptidos para formar multímeros incluyen los descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2007/0104704 y Publicación de EE.UU. 2007/0027074.

20 En otra realización, el agonista de Tie2 comprende un agente que activa Tie2 sin unirse a Tie2. La activación puede ser directa o indirecta. Por ejemplo, un inhibidor de un inhibidor de Tie2 activa indirectamente Tie2. Por consiguiente, un inhibidor de un inhibidor de Tie2 es un agente/agonista activador de Tie2. Un ejemplo de un inhibidor de un inhibidor de Tie2 es AKB9778 de Aerpio. Otro ejemplo de un inhibidor de un inhibidor de Tie2 es un anticuerpo que inhibe VE-PTP (el objetivo de AKB9778).

25 La descripción anterior describe en general la presente descripción. Se puede obtener una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos. Estos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la descripción. Se contemplan cambios en la forma y la sustitución de equivalentes según las circunstancias pueden sugerir o hacer conveniente. Aunque se han empleado términos específicos en el presente documento, dichos términos están dirigidos a un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente descripción:

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

40 Preparación de Vasculotida

Los péptidos T7 se hicieron reaccionar con una polietilenglicol-maleimida tetramérico de 10 kDa. Específicamente, se añadieron PEG activado y péptido T7 a un matraz de fondo redondo de 50 ml protegido de la luz y se añadió PBS (pH 6.5, 22 ml) para una concentración final de péptido de 5 mg/ml. La reacción se agitó a temperatura ambiente, el pH se verificó usando un medidor de pH y el progreso de la reacción se siguió por HPLC a diversos intervalos de tiempo. Después la mezcla de reacción se acidificó a pH 3.5 después de lo cual se llevaron a cabo las siguientes etapas:

ES 2 743 509 T3

Etapa 1 LC ultrarrápida:

Columna: Fase inversa C18, Fuji, 200A, 40 g columna de 30 µm (empaquetado personalizado)
Perfil de gradiente: 10-100% de B en 63 minutos
Eluyentes: Eluyente A = TFA al 0.1% en agua, Eluyente B = TFA al 0.1% en 60% de acetonitrilo, 40% de agua
Detección: UV (λ-210 nm/254 nm)
Temperatura de la columna: temperatura ambiente
Caudal: 40 ml/min

Etapa 2 HPLC preparativa:

Columna: Fase inversa C18, Daiso Bio C18, 200A, 10 µm 25 mm X 250 mm (empaquetado)
Perfil de gradiente: 50-100% de B en 70 minutos
Eluyentes: Eluyente A = HFBA al 0.1% en 3% de acetonitrilo en agua, Eluyente B = HFBA al 0.1% en 60% de acetonitrilo 40% de agua
Detección: UV (λ-210 nm)
Temperatura de la columna: temperatura ambiente
Caudal: 30 ml/min

Etapa 3 HPLC preparativa:

Columna: Fase inversa C18, Daiso Bio C18, 200A, 10 µm 25 mm X 250 mm (empaquetado personalizado)
Perfil de gradiente: 45-100% de B en 77 minutos
Eluyentes: Eluyente A = TFA al 0.1% en agua, Eluyente B = TFA al 0.1% en 60% de acetonitrilo, 40%
Detección: UV (λ-210 nm)
Temperatura de la columna: temperatura ambiente
Caudal: 30 ml/min

5

El material final para QC se liofilizó después de la etapa 3 en un vial tarado para determinar la cantidad de material. Esto dio como resultado una sal de trifluoroacetato de PEG de 10kDa-maleimida de 4 brazos (H-Cys (succinimido-propionilaminoetil)-His-His-His-Arg-His-Ser-Phe-OH)₄-PEG 10kDa.

Células e infección por gripe y *Staphylococcus aureus*

- 10 Las células endoteliales microvasculares pulmonares humanas primarias (HMVEC) obtenidas de Lonza se cultivaron en medio EBM-2 con los suplementos recomendados y se usaron en los pases 6-9. Las células endoteliales microvasculares pulmonares de ratón C57Bl/6 primarias se obtuvieron de Cell Biologics (Chicago, IL) y se cultivaron con medio de células endoteliales de ratón con los suplementos recomendados. Se usó la gripe A X31 (H3N2) ya que el subtipo H3N2 se asocia más comúnmente con complicaciones y muerte (Thompson et al., 2003); también se utilizó un aislado clínico (H3N2) para confirmar los descubrimientos clave. El virus se añadió a las células en medio exento de suero. Después de una hora, se añadió suero al 0,5%. Todas las infecciones fueron durante 24 horas a menos que se indique lo contrario. *S. aureus* (ATCC 29213) se inactivó por calor mediante incubación a 56°C durante 2 horas y se añadió a las células con una multiplicidad de infección de 100.

Ensayo de permeabilidad

- 20 Las HMVEC sembradas en placas Transwell de poliéster de poros de 0,4 µm (Costar) recubiertos con Factor de unión (Invitrogen) se cultivaron hasta confluencia durante 3-4 días. Después se midió el valor base de la permeabilidad a la fluoresceína-Na como se ha descrito previamente (Armstrong et al., 2012). Como planteamiento complementario, se midió la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) de monocapas endoteliales usando el Endohm-12 (WPI, Florida). Después, las células se trataron con virus de la gripe con diferentes multiplicidades de infección (MOI; definida como la proporción de unidades formadoras de placa a células endoteliales) durante 24 horas. Después se midieron la permeabilidad a la fluoresceína-Na y/o la TEER y se compararon con el valor base

(previo a la infección). Para los experimentos de cebado, se añadió Vasculotida (VT) 2 ng/ml al mismo tiempo que las bacterias.

Modelo de ratón de gripe grave

5 Se inoculó en ratones C57Bl/6 por vía intranasal virus de la gripe X31 (64-128 HAU/ratón) y se evaluó la fuga vascular pulmonar 4 días después de la infección. En algunos experimentos, se inyectó 400 ng de VT o vehículo de control por vía intraperitoneal inmediatamente después de la infección y diariamente después de eso. La amantadina se administró por sonda oral tres veces al día (46 mg/kg/ratón). La fuga vascular se evaluó midiendo la relación húmedo/seco de los pulmones o cuantificando la fuga de colorante azul de Evans; el colorante azul de Evans (EB) se une fuertemente a la albúmina y es un medio reproducible y preciso para evaluar la permeabilidad vascular (Patterson et al., 1992). Diez minutos antes de la eutanasia, se inyectaron 100 µl de EB al 1% a través de la vena de la cola. Se recogieron 200 µl de sangre completa para la medición de EB. Se abrió el tórax y el ratón se perfundió con 10 ml de PBS para lavar la vasculatura, después de lo cual se extrajeron los pulmones. El EB se extrajo del tejido mediante incubación en formamida y se registraron absorbancias a 620 (A620) y 740 (A740) nm. El contenido de EB se calculó corrigiendo A620 para hemo y se convirtió en µg de EB comparándolo con una curva patrón.

15 Resultados:

Modelo de ratón de neumonía viral primaria y lesión pulmonar aguda

Los ratones C57Bl/6 infectados con gripe (H3N2, 128 HAU/ratón) desarrollan pérdida de peso (**Fig. 1D**) y edema pulmonar marcado (Fig. 1A-C, E), muriendo aproximadamente 5 días después de la infección. La administración de VT (400 ng, por vía intraperitoneal al día, en el momento de la infección, prolongaba significativamente la supervivencia de los ratones infectados ($p < 0,001$) (Fig. 2). En un modelo menos grave de gripe en el que los ratones reciben 64 HAU de virus de la gripe, los ratones infectados mueren entre 5 y 8 días después de la infección. La administración de VT (400 ng, por vía intraperitoneal al día) incluso cuando se administra de forma retardada (Fig. 3A), aumentó significativamente la supervivencia. Además, la VT disminuyó la hipotermia inducida por la gripe (Fig. 3B) y redujo significativamente el edema pulmonar (Fig. 4). Cuando se administró conjuntamente con el fármaco antiviral amantadina, la VT aumentó significativamente la supervivencia de los ratones infectados con gripe en comparación con los controles que usan tanto la dosis más alta (Figura 5) como la dosis más baja (Figura 6A) de gripe. El beneficio de la VT se observó incluso si se administraba hasta 72 horas después de la infección (Fig. 6A). La VT mejoró significativamente los niveles de oxígeno arterial en ratones infectados (Fig. 6B-C), disminuyó la hipotermia inducida por la gripe (Fig. 6D) y atenuó la pérdida de peso inducida por la gripe (Fig. 6E). Sorprendentemente, la VT por sí misma no tiene actividad antiviral intrínseca y no tiene efecto sobre la quimiotaxis de leucocitos (Fig. 7). Sin estar limitados por la teoría, se cree que el mecanismo de beneficio es por la acción de la VT en el endotelio. Otra posible explicación es que la VT actúa sobre los tipos de células no endoteliales que expresan Tie2, tales como las poblaciones de leucocitos que expresan Tie2.

Modelo in vitro e in vivo de infección secuencial con gripe seguida de *S. aureus*

35 Los datos indican que la infección previa con gripe (MOI 0.1-1.0), incluso días antes, conduce a un marcado aumento en la permeabilidad endotelial pulmonar tras la exposición a *S. aureus* (Fig. 8A-C). La fuga después de la infección secuencial es mayor que en cualquier infección sola (es decir, es sinérgica) y es independiente de la polaridad endotelial (Fig. 8D); también es específica del orden, ya que la adición de *S. aureus* antes de la gripe no tiene el mismo efecto (Fig. 8E). Además, la fuga no se debe a una mayor adhesión de la bacteria al endotelio (Fig. 8F). Es importante destacar que la VT era capaz de prevenir casi por completo la fuga inducida por cebado a pesar de no tener ningún efecto sobre la replicación viral (Fig. 9A). El efecto beneficioso de la VT también se observó *in vivo* (Fig. 9B). Parece que la fuga se produce debido a la apoptosis, ya que la infección secuencial induce apoptosis endotelial pulmonar, un efecto que es atenuado por la VT (Fig. 9C).

Resumen

45 La potenciación o el efecto agonista de la actividad de Tie2, demostrada usando Vasculotida, aumenta significativamente la supervivencia en un modelo de ratón de gripe humana grave y aumenta la supervivencia cuando se administra conjuntamente con un fármaco antiviral, incluso si se administra de manera retardada. El tratamiento tradicional para la gripe usando fármacos antivirales es más efectivo si se administra al momento de la infección, y se vuelve progresivamente menos efectivo con el tiempo. Dado que los pacientes no pueden estar seguros del momento exacto de la infección, el beneficio prolongado de la administración tardía de VT es de relevancia clínica. Además, la exposición en dosis bajas a la gripe prepara el endotelio pulmonar para que tenga fugas tras la exposición posterior (incluso días después) a bacterias; este efecto es bloqueado por la Vasculotida.

55 La capacidad de fuga del endotelio pulmonar es un determinante importante de mortalidad por gripe humana grave, y la administración de Vasculotida es una terapia para tratar tanto la neumonía viral primaria como para disminuir el edema pulmonar y la mortalidad después de una sobreinfección bacteriana.

Si bien la presente descripción se ha descrito con referencia a lo que actualmente se consideran que son ejemplos, debe entenderse que la descripción no se limita a los ejemplos descritos.

Tabla de secuencias

SEQ ID NO	SECUENCIA	DESCRIPCIÓN
1	His His His Arg His Ser Phe	Péptido; Secuencia Artificial T7
2	Cys His His His Arg His Ser Phe	Péptido; Secuencia Artificial T7
3	Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys	Péptido; Secuencia Artificial GA3
4	Cys Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys	Péptido; Secuencia Artificial GA3
5	His Pro Trp Leu Thr Arg His	Péptido; Secuencia Artificial T8
6	Cys His Pro Trp Leu Thr Arg His	Péptido; Secuencia Artificial T8
7	Lys Leu Trp Val Ile Pro Lys	Péptido; Secuencia Artificial T6
8	Cys Lys Leu Trp Val Ile Pro Lys	Péptido; Secuencia Artificial T6
9	Asn Leu Leu Met Ala Ala Ser	Péptido; Secuencia Artificial T4
10	Cys Asn Leu Leu Met Ala Ala Ser	Péptido; Secuencia Artificial T4

Referencias:

- Anna Majury M.D., O.A.o.M.L. (2005). www.oaml.com/pps/Laboratory-Working-Group.pps. 17 de febrero de 2012
- 5 Armstrong, S.M., Khajooe, V., Wang, C., Wang, T., Tigdi, J., Yin, J., Kuebler, W.M., Gillrie, M., Davis, S.P., Ho, M., et al. (2012). Co-regulation of transcellular and paracellular leak across microvascular endothelium by dynamin and rac. *Am J Pathol* 180, 1308-1323.
- Cho, C.H., Kammerer, R.A., Lee, H.J., Yasunaga, K., Kim, K.T., Choi, H.H., Kim, W., Kim, S.H., Park, S.K., Lee, G.M. y Koh, G.Y. Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 5553-5558 (2004a).
- 10 Cho, C.H., Kammerer, R.A., Lee, H.J., Steinmetz, M.O., Ryu, Y.S., Lee, S.H., Yasunaga, K., Kim, K.T., Kim, I., Choi, H.H., Kim, W., Kim, S.H., Park, S.K., Lee, G.M. y Koh, G.Y. COMP-Ang1: a designed angiopoietin-1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 5547-5552 (2004b).
- David S., Ghosh C.C., Kumpers P., Shushakova N., Van Slyke P., Khankin E.V., Karumanchi S.A., Dumont D., y Parikh S.M. (2011). Effects of a synthetic PEG-ylated Tie-2 agonist peptide on endotoxemic lung injury and mortality. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 300:L851-L862.
- Davis S., Papadopoulos N., Aldrich T.H., Maisonpierre P.C., Huang T., Kovac L., Xu A., Leidich R., Radziejewska E., et al. (2003) Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. *Nat Struct Biol* 10(1):38-44.
- 20 Dominguez-Cherit, G., Lapinsky, S.E., Macias, A.E., Pinto, R., Espinosa-Perez, L., de la Torre, A., Poblano-Morales, M., Baltazar-Torres, J.A., Bautista, E., Martinez, A., et al. (2009). Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) in Mexico. *Jama* 302, 1880-1887.
- Falsey, A.R., y Walsh, E.E. (2006). Viral pneumonia in older adults. *Clin Infect Dis* 42, 518-524.
- Iverson, A.R., Boyd, K.L., McAuley, J.L., Piano, L.R., Hart, M.E., y McCullers, J.A. (2011). Influenza Virus Primes Mice for Pneumonia From Staphylococcus aureus. *J Infect Dis* 203, 880-888.
- 25 Kuiken, T., y Taubenberger, J.K. (2008). Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* 26 Suppl 4, D59-66.
- Kumpers P., Gueler F., David S., Van Slyke P., Dumont D.J., Park J-K, Bockmeyer C.L., Parikh S.M., Pavenstadt H., Haller H. y Shushakova. (2011). The synthetic Tie2 agonists peptide Vasculotide protects against vascular leakage and reduces mortality in murine abdominal sepsis. *Crit Care* 15:R261
- 30 Kuster, S.P., Drews, S., Green, K., Blair, J., Davis, I., Downey, J., Fowler, R., Katz, K., Lapinsky, S., McRitchie, D., et al. (2010). Epidemiology of influenza-associated hospitalization in adults, Toronto, 2007/8. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29, 835-843.

- Lee, W.L., y Slutsky, A.S. (2001). Ventilator-induced lung injury and recommendations for mechanical ventilation of patients with ARDS. *Semin Respir Crit Care Med* 22, 269-280.
- Louria, D.B., Blumenfeld, H.L., Ellis, J.T., Kilbourne, E.D., y Rogers, D.E. (1959). Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. *J Clin Invest* 38, 213-265.
- 5 Maines, T.R., Szretter, K.J., Perrone, L., Belser, J.A., Bright, R.A., Zeng, H., Tumpey, T.M., y Katz, J.M. (2008). Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response. *Immunol Rev* 225, 68-84.
- McGeer, A., Green, K.A., Plevneshi, A., Shigayeva, A., Siddiqi, N., Raboud, J., y Low, D.E. (2007). Antiviral therapy and outcomes of influenza requiring hospitalization in Ontario, Canada. *Clin Infect Dis* 45, 1568-1575.
- 10 Mohan, S.S., Nair, V., y Cunha, B.A. (2005). Post-viral influenza Streptococcus pneumoniae pneumonia in an intravenous drug abuser. *Heart Lung* 34, 222-226.
- Mura, M., Binnie, M., Han, B., Li, C., Andrade, C.F., Shiozaki, A., Zhang, Y., Ferrara, N., Hwang, D., Waddell, T.K., et al. (2010) Functions of type II pneumocyte-derived vascular endothelial growth factor in alveolar structure, acute inflammation, and vascular permeability. *Am J Pathol* 176, 1725-1734.
- 15 Oseasohn, R., Adelson, L., y Kaji, M. (1959). Clinicopathologic study of thirty-three fatal cases of Asian influenza. *N Engl J Med* 260, 509-518.
- Patterson, C.E., Rhoades, R.A., y Garcia, J.G. (1992). Evans blue dye as a marker of albumin clearance in cultured endothelial monolayer and isolated lung. *J Appl Physiol* 72, 865-873.
- 20 Peltola, V.T., y McCullers, J.A. (2004). Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J* 23, S87-97.
- Procopio, W.N., Pelavin, P.I., Lee, W.M. y Yeilding, N.M. Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo- oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity. *J. Biol. Chem.* 274, 30196-30201 (1999).
- 25 Schanzer, D.L., Tam, T.W., Langley, J.M., y Winchester, B.T. (2007). Influenza-attributable deaths, Canada 1990-1999. *Epidemiol Infect* 135, 1109-1116.
- Speshock, J.L., Doyon-Reale, N., Rabah, R., Neely, M.N., y Roberts, P.C. (2007). Filamentous influenza A virus infection predisposes mice to fatal septicemia following superinfection with Streptococcus pneumoniae serotype 3. *Infect Immun* 75, 3102-3111.
- 30 Teijaro, J.R., Walsh, K.B., Cahalan, S., Fremgen, D.M., Roberts, E., Scott, F., Martinborough, E., Peach, R., Oldstone, M.B., y Rosen, H. (2011). Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell* 146, 980-991.
- Thompson, W.W., Shay, D.K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L.J., y Fukuda, K. (2003). Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *Jama* 289, 179-186.
- 35 Tsigkos, S., Koutsilieris, M. y Papapetropoulos, A. Angiopoietins in angiogenesis and beyond. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 12, 933-941 (2003).
- VanSlyke, P., Alami, J.M.D., Kuliszewski, M.A., Leong-Poi, H., Sefton, M. y Dumont, D.J. Acceleration of diabetic wound healing by an angiopoietin eptidemimetic. eptide mimetic. *Tissue Eng Part A* 15(6), 1269-1280 (2009).
- Ward N.L. y Dumont, D.J. The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 19-27(2002).
- 40 Ward, N.L., Van Slyke, P. y Dumont, D.J. Functional inhibition of secreted angiopoietin: a novel role for angiopoietin 1 in coronary vessel patterning. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 937-946 (2004).

Listado de secuencias

- <110> Sunnybrook Research Institute St. Michael's Hospital
- 45 <120> MÉTODOS, USOS Y COMPOSICIONES DE AGONISTAS DE TIE2
- <130> 20925-P43930PC00
- <150> US 61/810,879
- 50 <151> 2013-04-11

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 1
His His His Arg His Ser Phe
15 1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

25 <400> 2
Cys His His His Arg His Ser Phe
1 5

<210> 3
<211> 22
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

35 <400> 3
Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln Arg
1 5 10 15

Thr Trp Lys Glu Tyr Lys
20

40 <210> 4
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 4
Cys Trp Thr Ile Ile Gln Arg Arg Glu Asp Gly Ser Val Asp Phe Gln
1 5 10 15

Arg Thr Trp Lys Glu Tyr Lys
50 20

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 5
 His Pro Trp Leu Thr Arg His
 5 1 5

 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 15 <400> 6
 Cys His Pro Trp Leu Thr Arg His
 1 5

 <210> 7
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético

 25 <400> 7
 Lys Leu Trp Val Ile Pro Lys
 1 5

 <210> 8
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Peptide

 35 <400> 8
 Cys Lys Leu Trp Val Ile Pro Lys
 1 5

 40 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Péptido sintético

 <400> 9
 Asn Leu Leu Met Ala Ala Ser
 1 5

 50 <210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Péptido sintético

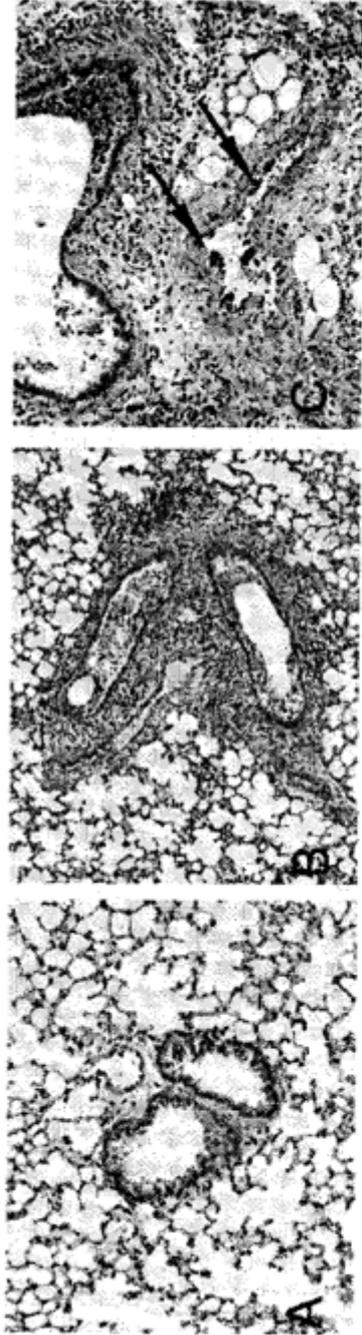
 <400> 10
 Cys Asn Leu Leu Met Ala Ala Ser
 60 1 5

REIVINDICACIONES

1. Un agonista de Tie2 para usar en un método de tratamiento de un animal infectado con gripe, comprendiendo el método administrar el agonista de Tie2 al animal; en donde el agonista de Tie2 comprende una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie2; en donde el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido T7 como se muestra en las SEQ ID NO: 1 o 2; un péptido GA3 como se muestra en las SEQ ID NO: 3 o 4; un péptido T4 como se muestra en las SEQ ID NO: 9 o 10; un péptido T6 como se muestra en las SEQ ID NO: 7 u 8 o un péptido T8 como se muestra en las SEQ ID NO: 5 o 6; opcionalmente en donde la forma multimérica es un tetrámero o un dímero.
2. El agonista de Tie2 para usar según la reivindicación 1, en donde el animal tiene una sobreinfección bacteriana asociada con la gripe.
3. El agonista de Tie2 para usar según la reivindicación 1 o 2, comprendiendo el método además el uso de un agente antiviral, opcionalmente en donde el agente antiviral es amantadina, rimantadina, zanamivir, peramivir, virmidina, ribavirina u oseltamivir, opcionalmente en donde el agente antiviral se usa simultánea o secuencialmente.
4. El agonista de Tie2 para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la gripe es gripe humana.
5. El agonista de Tie2 para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde en el método, el agonista de Tie2 se administra al menos 24 horas después de infección; al menos 48 horas después de infección o al menos 72 horas después de infección.
6. El agonista de Tie2 para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido T7 como se muestra en las SEQ ID NO: 1 o 2 o un péptido GA3 como se muestra en las SEQ ID NO: 3 o 4.
7. El agonista de Tie2 para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido T4, un péptido T6 y un péptido T8 como se muestra en las SEQ ID NO: 5-10.
8. El agonista de Tie2 para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la forma multimérica es un dímero, que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; y (c) un resto de conexión que conecta dichas cadenas peptídicas primera y segunda, en donde dicho dímero peptídico se une y activa el receptor Tie2, opcionalmente en donde la primera cadena peptídica es un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2) y/o la segunda cadena peptídica es un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2); opcionalmente en donde el resto de conexión comprende uno o más polímeros de polietilenglicol (PEG) unidos covalentemente a la primera cadena peptídica y la segunda cadena peptídica.
9. El agonista de Tie2 para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la forma multimérica comprende un péptido tetrámero, que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; (c) una tercera cadena peptídica; (d) una cuarta cadena peptídica; y (e) un resto de conexión que conecta dichas cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta, en donde dicho tetrámero peptídico se une y activa el receptor Tie2, en donde las cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta son péptidos T7 (SEQ ID NO: 1 o 2), opcionalmente en donde el resto de conexión comprende uno o más polímeros ramificados de polietilenglicol (PEG) unidos covalentemente a la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas, en donde el PEG opcionalmente tiene un peso molecular en un intervalo de aproximadamente 3 000 Daltons a aproximadamente 20 000 Daltons, opcionalmente 10 000 Daltons.
10. Un kit que comprende (a) un agonista de Tie2 y (b) un agente antiviral, opcionalmente en donde el agente antiviral es amantadina, rimantadina, zanamivir, peramivir, virmidina, ribavirina u oseltamivir; en donde el agonista de Tie2 comprende una forma multimérica de un monómero peptídico de unión a Tie2; en donde el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido T7 como se muestra en las SEQ ID NO: 1 o 2; un péptido GA3 como se muestra en las SEQ ID NO: 3 o 4; un péptido T4 como se muestra en las SEQ ID NO: 9 o 10; un péptido T6 como se muestra en las SEQ ID NO: 7 u 8 o un péptido T8 como se muestra en las SEQ ID NO: 5 o 6.
11. El kit de la reivindicación 10, en donde la forma multimérica es un tetrámero o dímero.
12. El kit de la reivindicación 10 u 11, en donde el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido T7 como se muestra en las SEQ ID NO: 1 o 2 o comprende un péptido GA3 como se muestra en las SEQ ID NO: 3 o 4.
13. El kit de la reivindicación 10 u 11, en donde el monómero peptídico de unión a Tie2 comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido T4, un péptido T6 y un péptido T8 como se muestra en las SEQ ID NO: 5-10.
14. El kit de la reivindicación 10 u 11, en donde la forma multimérica es un dímero, que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; y (c) un resto de conexión que conecta dichas cadenas

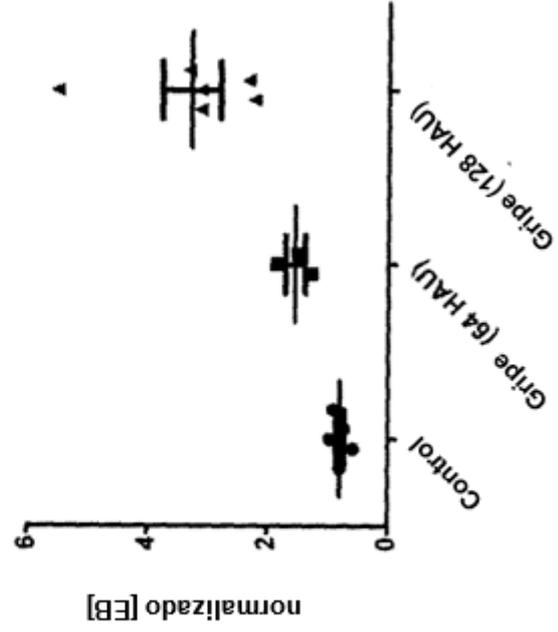
peptídicas primera y segunda, en donde dicho dímero peptídico se une y activa el receptor Tie2, opcionalmente en donde la primera cadena peptídica es un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2) y/o la segunda cadena peptídica es un péptido T7 (SEQ ID NO: 1 o 2), opcionalmente en donde el resto de conexión comprende uno o más polímeros de polietilenglicol (PEG) unidos covalentemente a la primera cadena peptídica y a la segunda cadena peptídica.

- 5 15. El kit de la reivindicación 10 u 11, en donde la forma multimérica comprende un péptido tetramero, que comprende: (a) una primera cadena peptídica; (b) una segunda cadena peptídica; (c) una tercera cadena peptídica; (d) una cuarta cadena peptídica; y (e) un resto de conexión que conecta dichas cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta, en donde dicho tetramero peptídico se une y activa el receptor Tie2, en donde las cadenas peptídicas primera, segunda, tercera y cuarta son péptidos T7 (SEC ID NO: 1 o 2), opcionalmente en donde
- 10 el resto de unión comprende uno o más polímeros ramificados de polietilenglicol (PEG) unidos covalentemente a la primera, segunda, tercera y cuarta cadenas peptídicas, en donde el PEG opcionalmente tiene un peso molecular en un intervalo de aproximadamente 3 000 Daltons a aproximadamente 20 000 Daltons, opcionalmente 10 000 Daltons.



Fuga microvascular pulmonar dependiente de la dosis después de la gripe

E



D Efecto de la gripe en el peso del ratón

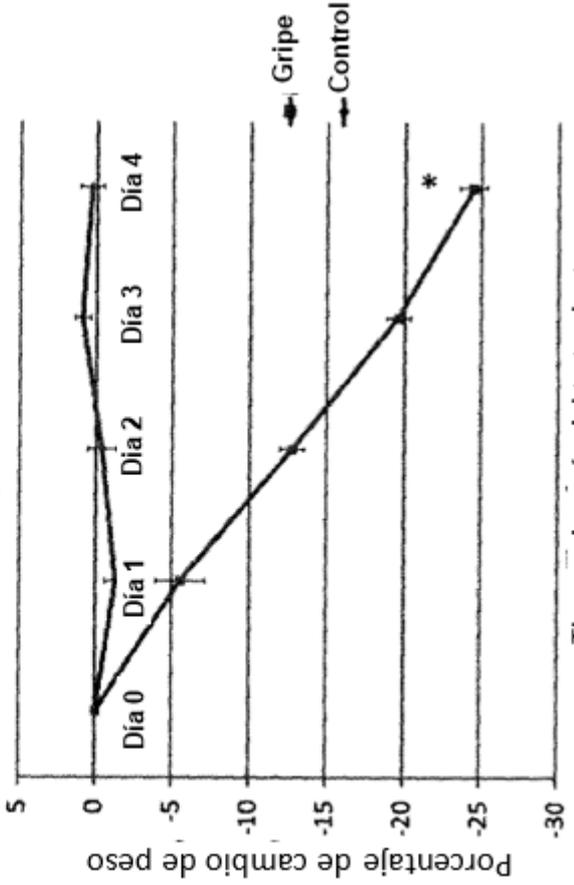


FIGURA 1

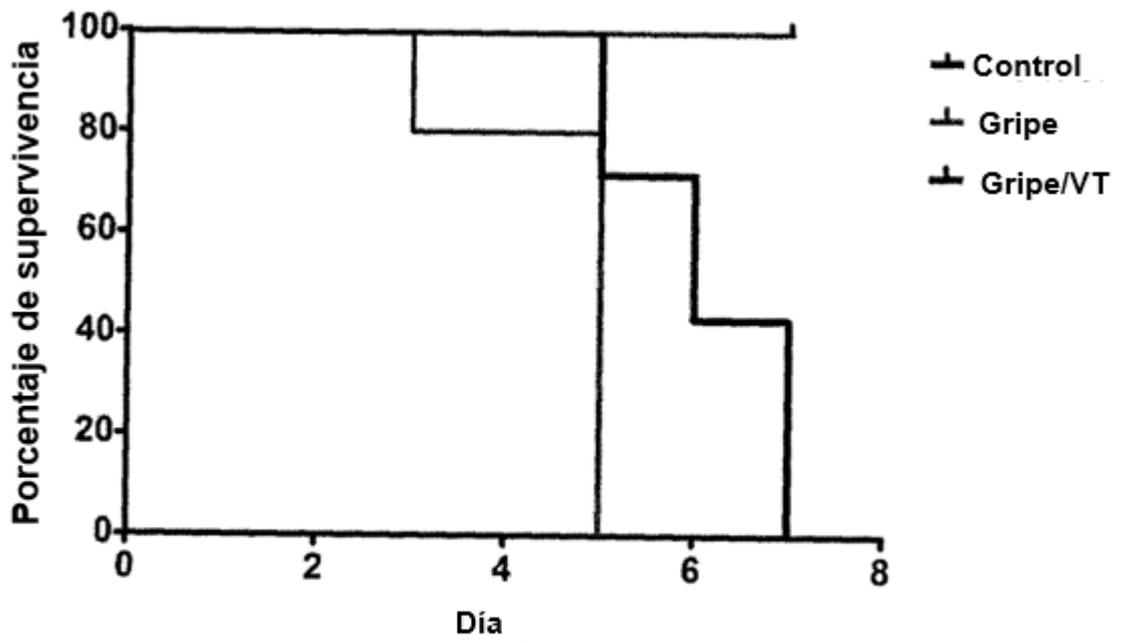


Figura 2

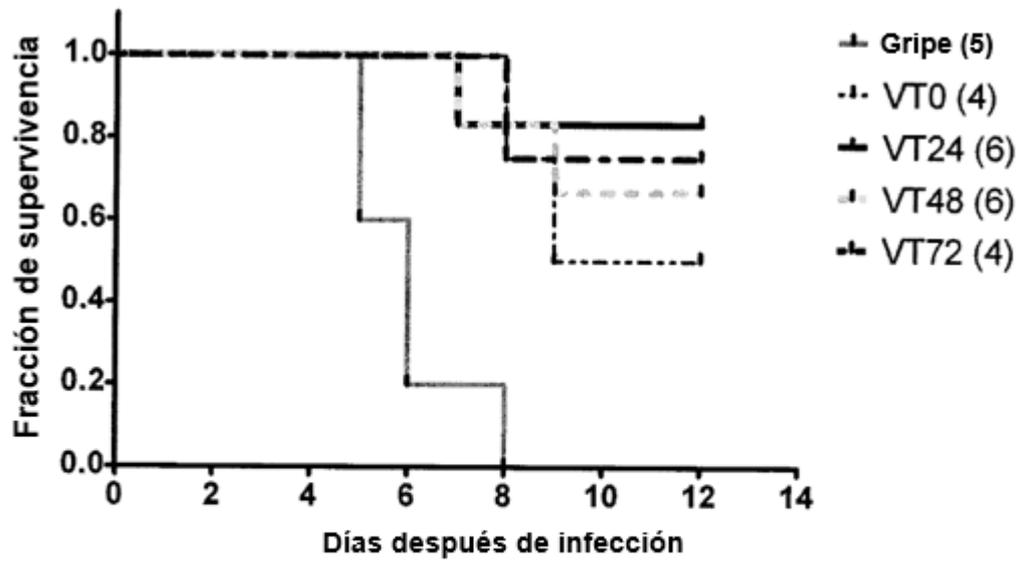


Figura 3A

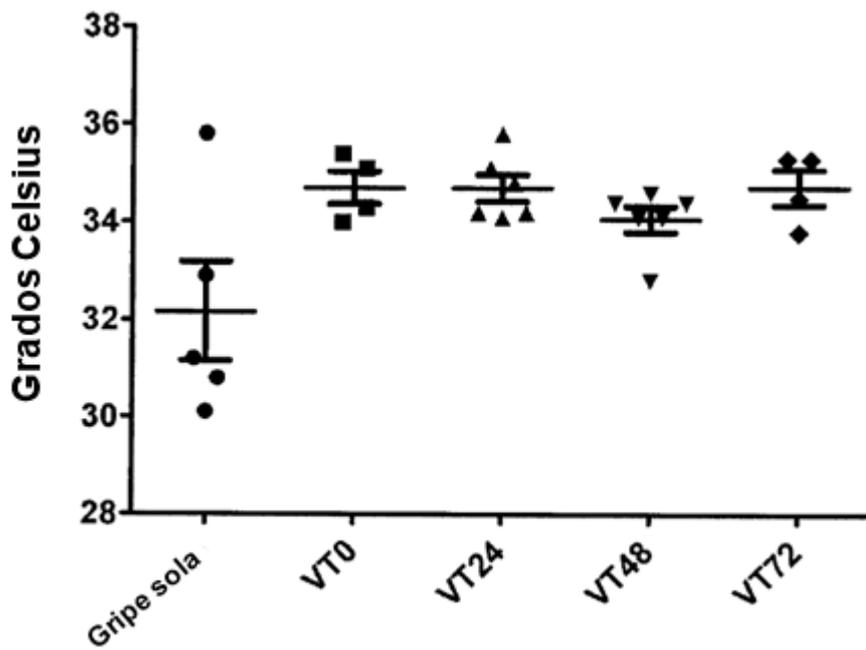


Figura 3B

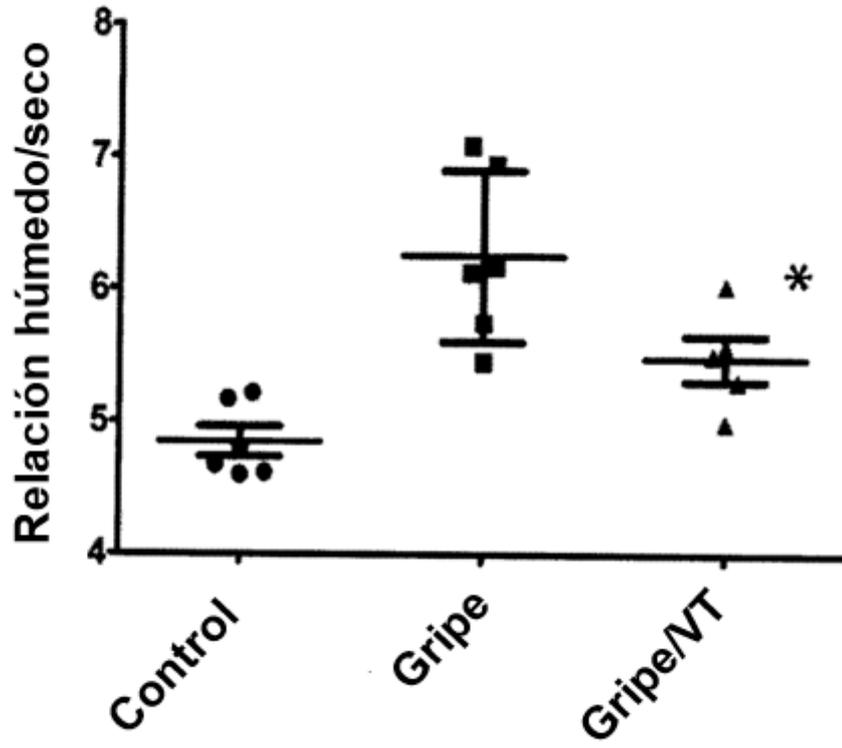


FIGURA 4

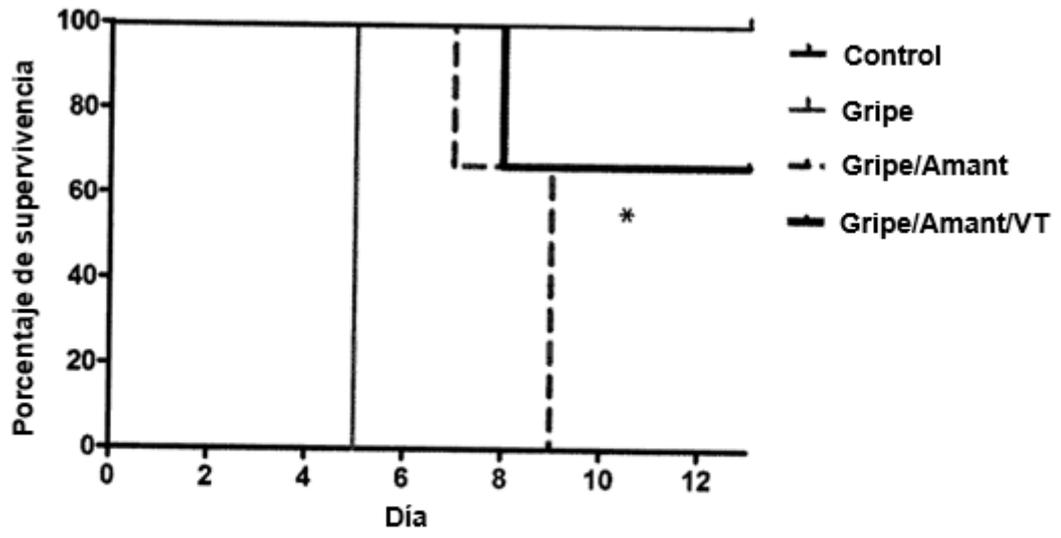


FIGURA 5

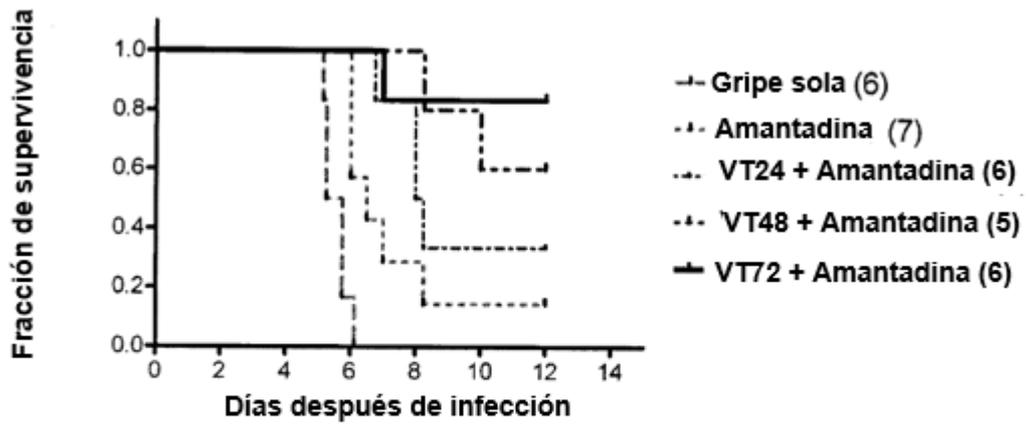


Figura 6A

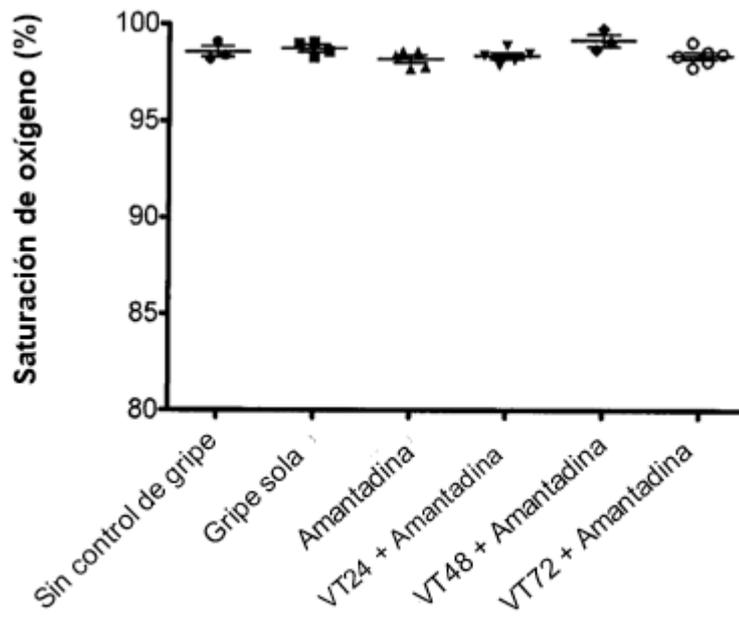


Figura 6B

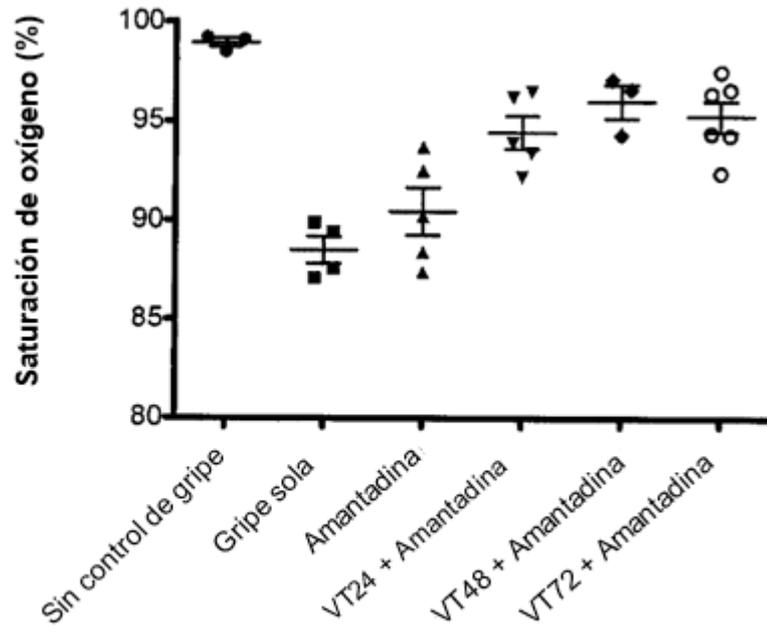


Figura 6C

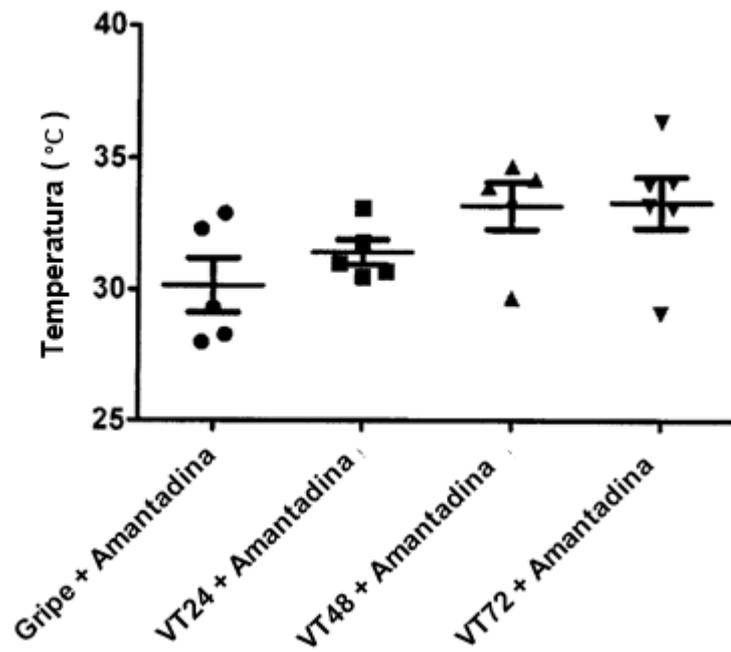


Figura 6D

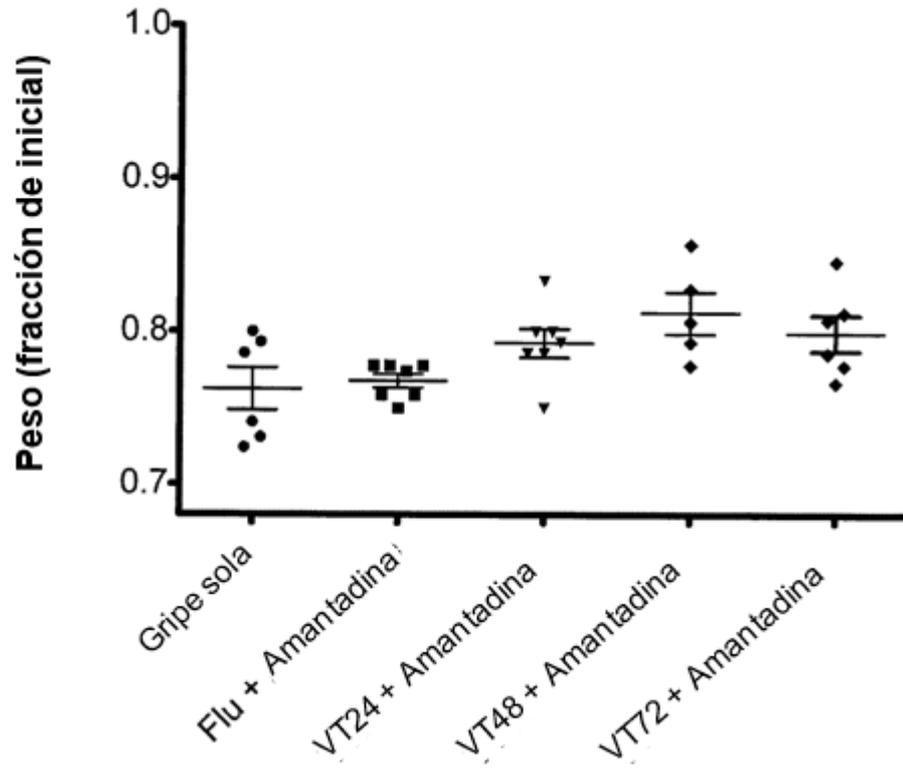
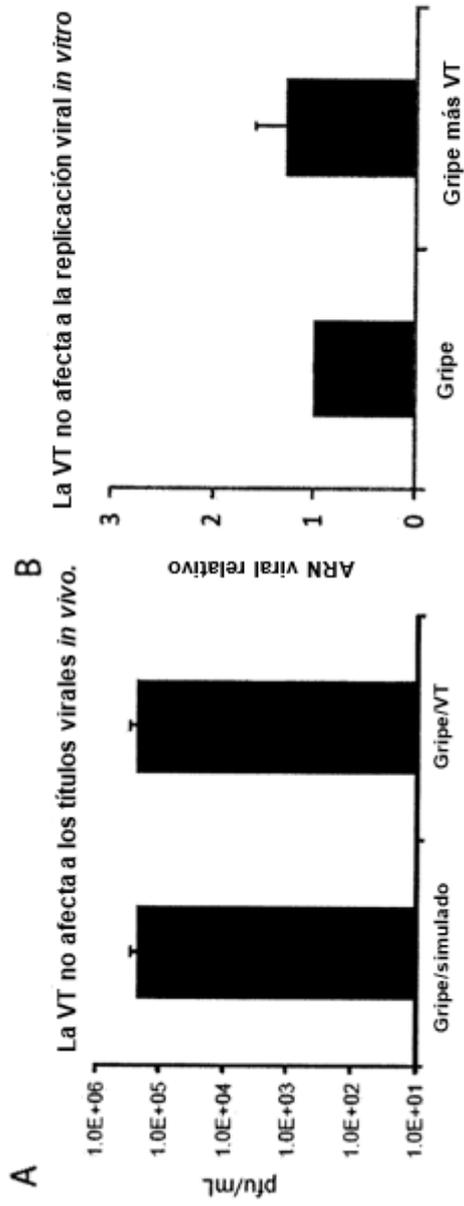


Figura 6E



C La VT no afecta a la quimiotaxis de monocitos **D** La VT no afecta a la quimiotaxis de neutrófilos

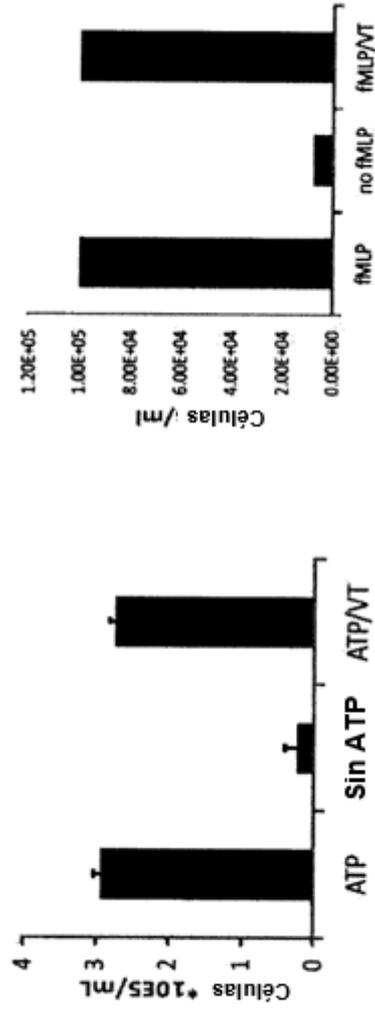


Figura 7

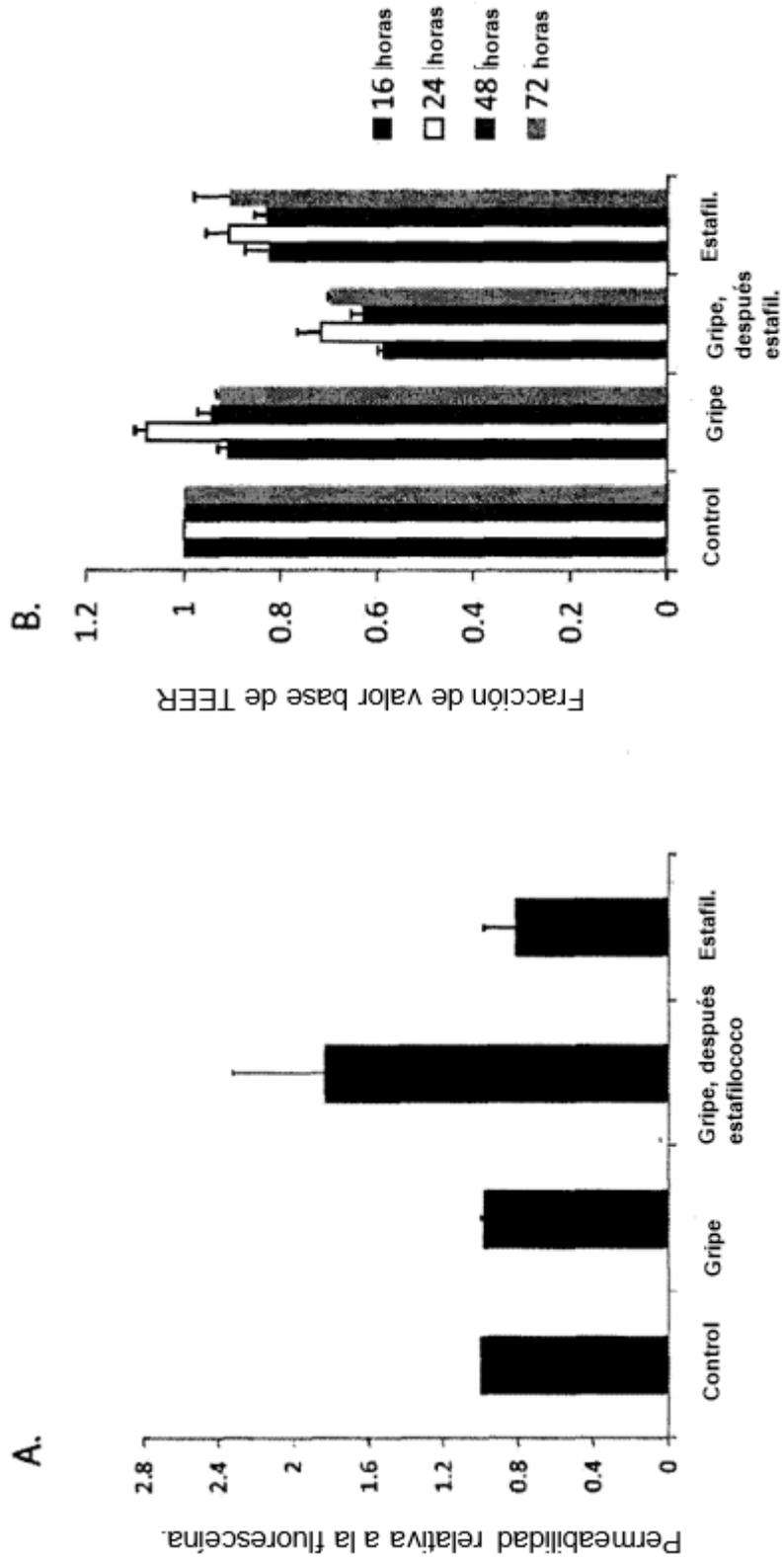


Figura 8

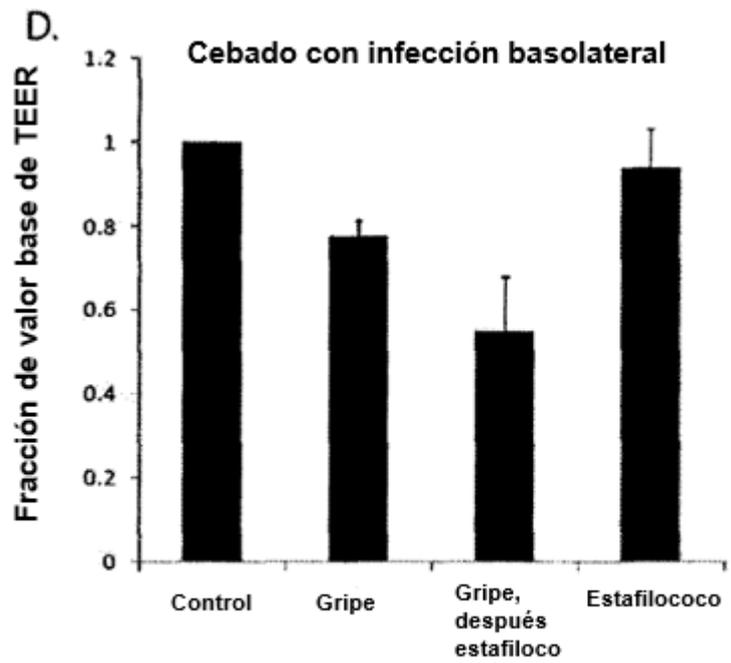
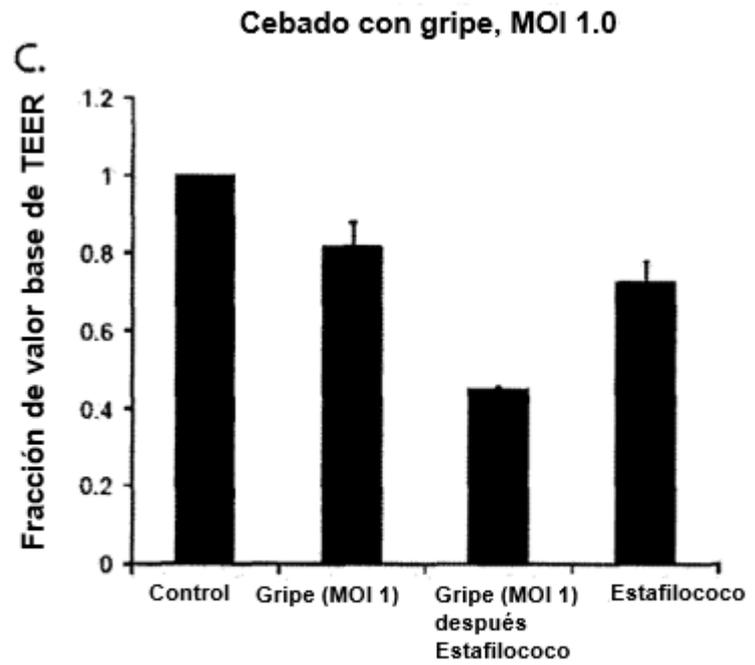


FIGURA 8 CONT.

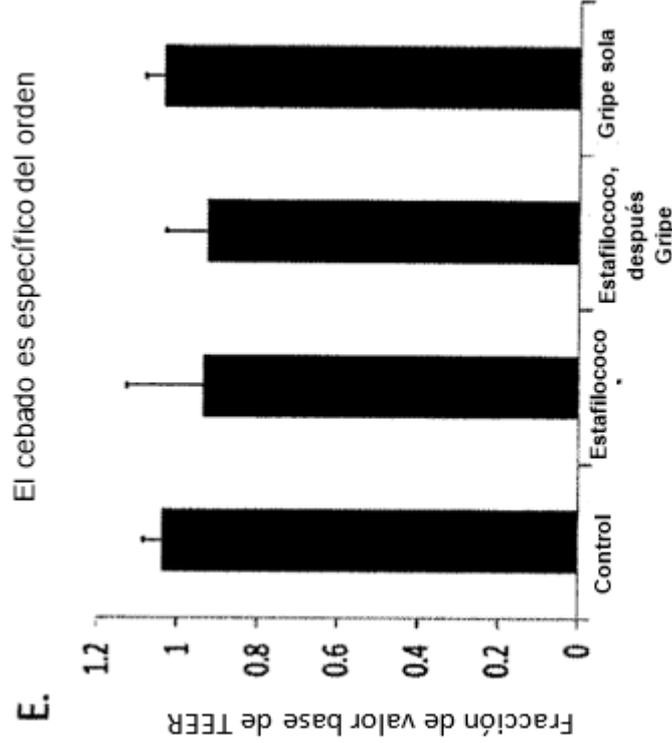
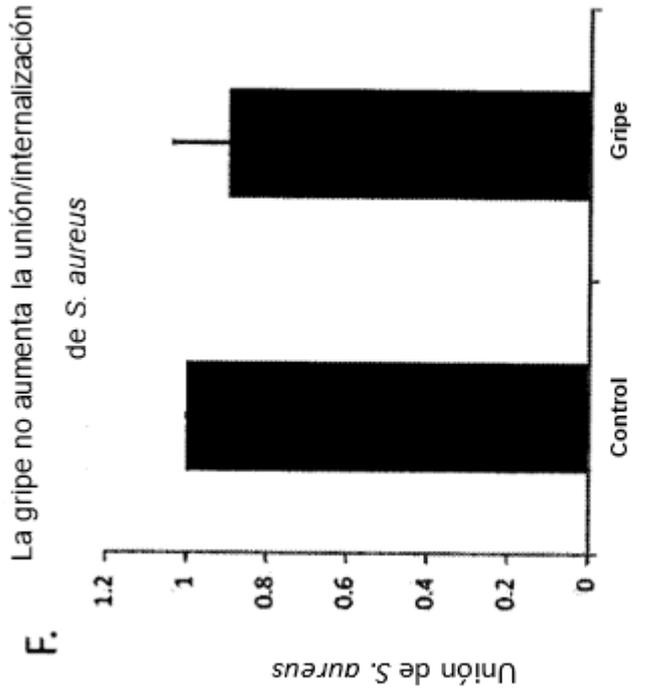


Figura 8 CONT.

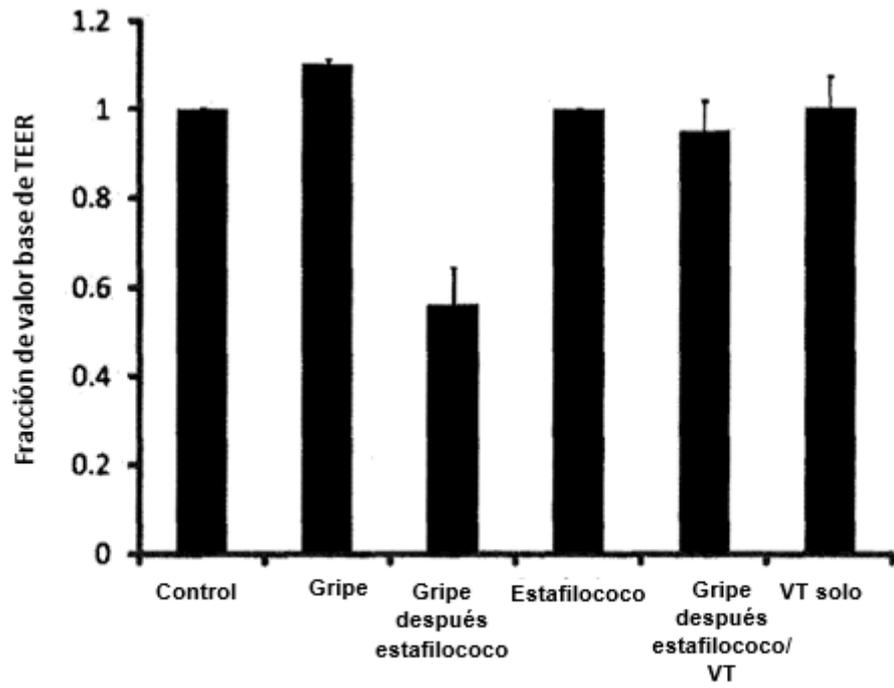


Figura 9A

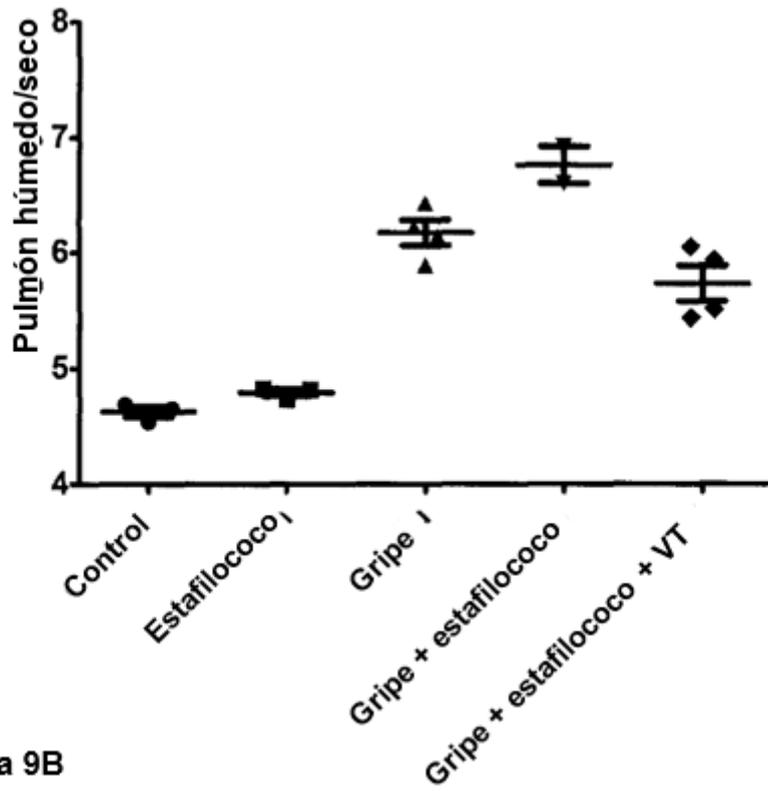


Figura 9B

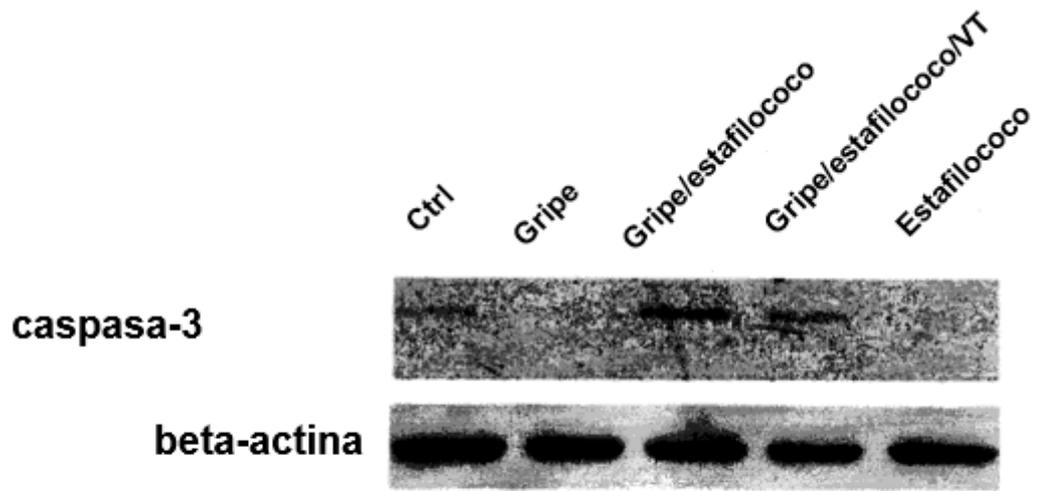


Figura 9C