

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 248**

21 Número de solicitud: 201930571

51 Int. Cl.:

C07K 14/24 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

21.06.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

28.12.2020

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (53.0%)**

C/ Serrano, nº 117

28006 Madrid ES;

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (20.0%) y

FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN

SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (27.0%)

72 Inventor/es:

COLÁS ALGORA, Natalia ;

MILLÁN MARTÍNEZ, Jaime ;

CABALLERO LOMBRANA, Álvaro y

RIBAS NUÑEZ, Catalina

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **COMPUESTOS PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO Y/O LA PREVENCIÓN DE SEPTICEMIA**

57 Resumen:

Compuestos para su uso en el tratamiento y/o la prevención de septicemia. La presente invención se refiere a proteínas que comprenden el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY), para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto.

ES 2 800 248 A1

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO Y/O LA PREVENCIÓN DE SEPTICEMIA

5

La presente invención se refiere a proteínas que comprenden el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY), para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto. La presente invención se engloba por tanto en la campo de la medicina, más específicamente, en el tratamiento y la prevención de sepsis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La sepsis es una enfermedad caracterizada por una respuesta inflamatoria sistémica incontrolable a la infección. La sepsis bacteriana es un síndrome inflamatorio sistémico complejo causado por una infección bacteriana agresiva en la sangre. La sepsis causa una morbilidad y mortalidad elevadas en humanos y otros animales. En los Estados Unidos, la sepsis es la causa principal de muerte nosocomial para humanos (particularmente en la unidad de cuidados intensivos) y muerte de infecciones en ganado joven y otros 65 animales. Cada año, se diagnostican alrededor de 700.000 casos de sepsis en humanos. Extrapolado a la población global, esto representa varios millones de casos de sepsis grave de forma mundial y anual. Las tasas de mortalidad varían desde aproximadamente 20% a 30% y representan por lo menos 150.000 muertes al año en los Estados Unidos.

25

El Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre (NHLBI, por sus siglas en inglés) del NIH define la sepsis como "síndrome de disfunción endotelial severo en respuesta a infecciones intravasculares y extravasculares que causan lesiones reversibles o irreversibles a la microcirculación responsable de un fallo orgánica múltiple". En realidad, niveles elevados de biomarcadores celulares endoteliales de permeabilidad y hemostasia se asocian con una mayor mortalidad en pacientes con sepsis.

La sepsis puede resultar de muchas causas, pero normalmente se desencadena por episodios, tales como neumonía, traumatismo, cirugía y quemaduras o por afecciones,

tales como cáncer o SIDA. La sepsis empieza normalmente con temblores, fiebre, bajada de la presión sanguínea (choque séptico), respiración rápida, frecuencia cardiaca elevada y lesiones dérmicas. En horas, la sepsis puede causar la coagulación espontánea en vasos sanguíneos, hipotensión grave, fallo orgánico múltiple, 5 conmoción y finalmente la muerte. Habitualmente, estos síntomas están causados por la activación excesiva o incontrolada de los mecanismos de defensa del huésped, tales como citoquinas, leucocitos y complemento.

La sepsis está causada normalmente por infecciones bacterianas (ya sean bacterias 10 Gram negativas o Gram positivas), pero también puede estar causada por otros patógenos, tales como hongos, virus, parásitos y estímulos no infectivos, tales como superantígenos. Sin embargo, más frecuentemente, la sepsis está causada por infecciones de bacterias Gram negativas. La lesión y síntomas atribuibles a la sepsis no sólo están causadas por las bacterias, sino que también están causadas por un 15 componente de la pared celular bacteriana conocida como endotoxina o lipopolisacárido (LPS). Las moléculas de LPS son glicolípidos que están omnipresentes en la membrana externa de todas las bacterias gram-negativas. Aunque la estructura química conocida de la molécula de LPS es compleja y diversa, una característica común es la región de lípido A. El reconocimiento de la región de 20 lípido A de LPS altamente conservada inicia muchos, si no todos, los episodios responsables de la sepsis. Se libera LPS cuando el sistema inmune destruye la bacteria invasora. La LPS liberada se une a monocitos, macrófagos y células endoteliales y desencadena la producción de varios mediadores, tales como el factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) e interleuquinas (IL-1, IL-6, e IL-8). La producción de 25 un exceso de TNF- α , IL-1, IL-6, e IL-8 es la causa principal de sepsis.

La subfamilia RhoA de GTPasas comprende tres proteínas Rho clásicas, RhoA, RhoB y RhoC, que comparten el 88% de la identidad de aminoácidos. Regulan los efectores comunes, como las Rho quinasas (ROCK) y desempeñan roles redundantes, 30 complementarios y específicos en muchos contextos celulares. En las barreras endoteliales, se considera que la subfamilia RhoA es el mediador principal en la contracción filamentosa mediada por (F)-actina, que causa una interrupción aguda de la barrera endotelial en respuesta a los mediadores inflamatorios, en oposición a otras subfamilias Rho GTPasa que median la mejora de la barrera endotelial. Sin embargo, 35 en otros tipos de células organizadas en monocapas, como las epiteliales, la

subfamilia RhoA desempeña un doble papel. Por un lado, media en la contracción mediada por F-actina y la interrupción de la barrera, por otro lado, estas GTPasas contribuyen al mantenimiento de las uniones célula-célula. Previamente, se ha demostrado que la actividad de RhoB inhibe la recuperación endotelial en la
5 contracción aguda y afecta la integridad de la barrera, mientras que el silenciamiento del gen RhoC con un pequeño ARN interferente (ARNsi), provoca una disfunción homeostática de las barreras endoteliales humanas, lo que sugiere que la actividad de RhoC es necesaria para el mantenimiento de la barrera endotelial.

10 Los métodos conocidos para tratar la sepsis incluyen antibacterianos, anticuerpos, moléculas pequeñas y péptidos, proteína C, terapia de apoyo con oxígeno, fluidos intravenosos y medicamentos que incrementan la presión sanguínea. Por ejemplo, la solicitud de patente US20030021783 describe la utilización de anticuerpos anti-IL8 para el tratamiento de la sepsis, la solicitud de patente US20030008822 describe la
15 utilización de anticuerpos anti-IL18 para el tratamiento de la sepsis, la solicitud de patente US20020165138 describe la utilización de anticuerpos anti-C5a y péptidos C5a truncados en C-terminal para la prevención y el tratamiento de sepsis en animales, la solicitud de patente US20020155094 describe la utilización de quimioquinas y fragmentos de quimioquinas para el tratamiento de la sepsis, la
20 solicitud de patente US20020044929 describe la utilización de una combinación de proteína C y proteína BPI para el tratamiento de la sepsis, y la solicitud de patente US20020006915 describe la utilización de inhibidores de COX-2 para tratar la sepsis. Sin embargo, ninguno de estos tratamientos tiene como diana los vasos sanguíneos y la prevención de la rotura de las barreras endoteliales que causan edema masivo.

25

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en el descubrimiento de que el factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) activa el endotelio endógeno RhoA,
30 RhoB y RhoC, estabiliza las uniones adherentes, mejora la función de la barrera *in vitro* (ver Ejemplos 1 y 2 de la presente descripción) y previene el aumento de la permeabilidad en respuesta a mediadores inflamatorios *in vivo* (ver Ejemplo 3 de la presente descripción). Debido a estas actividades, el CNFY no solo es capaz de prevenir y/o tratar enfermedades que cursan con daño endotelial, como la sepsis, sino
35 también prevenir la formación de edemas y/o el tratamiento de edemas ya formados

asociados a la sepsis, tal como se demuestra en el Ejemplo 4.

Por lo tanto, la presente invención es útil para fortalecer la integridad de la barrera de las células endoteliales humanas y las uniones entre las células endoteliales.

5 Adicionalmente, la invención reduce la interrupción de la barrera endotelial en respuesta a mediadores inflamatorios y proangiogénicos, el edema de órganos, y la pérdida de proteínas de la unión célula-célula.

Así, en un aspecto, la presente invención se relaciona con una proteína, o la
10 secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, que comprende el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY), de aquí en adelante “proteína de la invención”, para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto (de aquí en adelante “uso de la proteína de la invención”).

15

En la presente invención, se entiende por “factor necrótico citotóxico” (o CNF de sus siglas en inglés *Cytotoxic Necrotizing Factor*) a la toxina de naturaleza proteica producida por bacterias patógenas que se une a la familia Rho de las GTPasas, como por ejemplo RhoA, RhoB y RhoC, y lleva a cabo una reacción de deamidación, lo que
20 da lugar la activación de dicha familia de proteínas Rho. Ejemplos de CNF incluyen, sin limitar a, CNF1, CNF2 y CNF3 de *Escherichia coli*, CNFY de *Yersinia pseudotuberculosis*, y DNT (del inglés *Dermonecrotic Toxin*) de *Bordetella* spp. En la proteína de la invención, el dominio catalítico es el dominio catalítico del factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY).

25

El término “CNFY” o “CNFY” se refiere a la proteína tóxica llamada factor necrótico citotóxico (en inglés *Cytotoxic Necrotizing Factor*) producida por *Yersinia pseudotuberculosis*, y que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (NCBI Reference Sequence: WP_111779455.1), en donde los aminoácidos 1-715
30 corresponden a un dominio de inyección que permite la unión y la penetración de la toxina (aquí denominado “dominio no catalítico”), y los aminoácidos 716-1014 corresponden al dominio catalítico responsable de la activación de la familia de proteína Rho. En la presente invención se entiende por “dominio de inyección” o “dominio no catalítico” a la secuencia que permite la unión y la penetración intracelular

de un dominio catalítico de un activador de GTPasa. Por “dominio catalítico” a aquella parte de la proteína que es capaz de activar las proteínas Rho.

SEQ ID NO: 1:

5
 1 MKNQWQHQYF LSYSELVANF PSPEKVVSDY IKHKFSTTLP WFGWADPDNL YFIRFTQSRS
 61 NNKSYTGWDH LGKYAIETLT LTQAAIVNIG SRFDIFDEAN STAGIYKTNN ADSFDETNEA
 121 KMLPSEYLYF LRDCDFSPLY NKALSDYWAE NYEKFSTLLQ NYYISSAYYL YKDSAISKDE
 181 YEFSDAIFN KSKILRYFF DVYGYSSDM FVAMNDNKTMLFIPGATNPF IFADNITDLR
 10 241 DKIKALISDK NTRELFKHF SLYDRQDGT YLGVNSMLEQ IVSGVVDTNY IMYSNKNIRE
 301 RNVFGSMAFS TRERSFNDGD VIKSNAEVQ RDYALNVLQT ILSLSPIFDI VLPEVSIPI
 361 LGITASSVGI SFDELINGDT YEERRSAIPG LATNTVLLGI SFAIPFLISK AEENKLIINN
 421 LVGSDENILN KNNLGFLEK YNISESDIPE NGSLVINLKN TNVPVRLVKL NDEEGEIVAI
 481 KGSTLSGIYY EVDTETGYEI LSRRVFRTEY NEKIYWTRGG GLKGGQPFNF EGLDIPVYFI
 15 541 DKPYSELASS VELSFVNDDS PLLFPEMDSR LPKPTPELDI KYSSNLSSF KEDTVILMRG
 601 TTEEEAWNIA NYKTAGGSNK DLEENFIEAG PQFNLSFSEY TSSINSADTA SRKHFLVLIK
 661 VQKYISNDN VLYANHWAIP DEAPVEVLAV VDRRFIFPEP PVKPKLSFIQ KIANRFLTEN
 721 VAEISSINFR RLNSGNINVL KGRGVFSSRR LREIYLRFDA ANADELRPGD VYVKKTKFDS
 781 MGYDSHFYNE GINGINGAPTL NTYTGEYVAD SSSQGATYWL KYNLTNETSI IKVNSARGA
 20 841 NGIKIALEEI EENKPVVITS GTLTGCTVVF ARKGEYFYAV HTGNSESLIG FTSTSGVAKA
 901 IEVLSSELSEV EVPALPDVIN NNTLVEYLSN NFDSALISYS SSSLKPNMI NISRENVSTF
 961 SYYTDDIQLP SFGTSVTILV RTNDNTVVRSLSESYTMNSN SSKMVFVNVL QKDF

En una realización más particular, el dominio catalítico de la proteína de la invención
 25 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de, al
 menos, el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 2
 (dominio catalítico de CNFY que corresponde a los aminoácidos 716-1014 de la
 secuencia SEQ ID NO: 1). En otra realización todavía más particular, el dominio
 catalítico de la proteína de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que
 30 tiene un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: 2:

35 FLTENVAEIS SINFRLNSG NINVLKGRGV FSSRRLREIY LRFDAANADE LRPGDVYVKK
 TKFDSMGYDS HFYNEGIGIN GAPTLNTYTG EYVADSSSQG ATYWLKYNLT NETSIKIVSN
 SARGANGIKI ALEEIEENKP VVITSGTLTG CTVVFARKGE YFYAVHTGNS ESLIGFTSTS
 GVAKAIEVLS SLSELEVPAL PDVINNNTLV EYLSDNFDSA LISYSSSLK PNSMINISRE
 NVSTFSYYTD DIQLPSFGTS VTILVRTNDN TVVRSLSESY TMNSNSSKMV VFNVLQKDF

40 En la presente invención, se entiende por “identidad” o “identidad de secuencia” al
 grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido
 mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos
 comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad
 expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de
 45 aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante

algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo BLAST. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Como entiende el experto en la materia, todas las proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de, al menos, un 70% con una secuencia de referencia, y que presentan la misma función que la proteína CNFY, i.e. llevar a cabo una reacción de deamidación que da lugar la activación de la familia Rho de GTPasas, en particular, la proteína RhoA and/or RhoC, son variantes funcionalmente equivalentes de la proteína de la invención, y todas ellas pueden usarse en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto. Las variantes funcionalmente equivalentes pueden comprender mutaciones tales como deleciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia, siempre y cuando estas mutaciones no afecten a su funcionalidad. Por lo tanto, las sustituciones preferiblemente corresponden a sustituciones conservativas. Ensayos para identificar proteínas funcionalmente equivalentes a la proteína de la invención se pueden encontrar en el Ejemplo de la presente descripción.

Asimismo, la proteína de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto, puede comprender modificaciones químicas que incrementan su estabilidad y/o su biodisponibilidad. Dichas modificaciones químicas también pueden tener como objetivo proteger la proteína de ataques enzimáticos, como aquellos que conllevan la degradación de la proteína, y/o incrementar su capacidad de atravesar las membranas, incrementando de esta manera la vida media de la proteína, manteniendo o incrementando su actividad biológica. Cualquier modificación química conocida en el estado de la técnica puede emplearse en la presente invención. Ejemplos de dichas modificaciones químicas incluyen, sin limitarse a:

- Reemplazo de un aminoácido por un aminoácido modificado y/o inusual,
- Modificaciones en los extremos amino- y carboxilo- terminal de las proteínas, tales como acilación amino-terminal (preferiblemente acetilación) o desaminación, o modificación del grupo carboxilo terminal a un grupo amida o un grupo alcohol,
- Modificaciones en el enlace amida entre dos aminoácidos: acilación (preferiblemente acetilación) o alquilación (preferiblemente metilación) en el

átomo de nitrógeno o el carbón alfa del enlace amida que une dos aminoácidos,

- Cambios quirales, tales como sustitución de uno o más aminoácidos que ocurren de forma natural (enantiómero L) por los correspondientes enantiómeros D,
- Retro-inversiones en las que uno o más aminoácidos que ocurren de forma natural (enantiómero L) son reemplazados por el correspondiente enantiómero D, junto con la inversión de la cadena de aminoácidos (desde el carboxilo-terminal and amino-terminal),
- Azapéptidos, en las que el grupo amino de uno o más aminoácidos se une al carbón beta en lugar de al carbón alfa.

El dominio catalítico de la proteína de la invención puede localizarse tanto en el extremo amino- como carboxilo-terminal. No obstante, en una realización particular, el dominio catalítico de la proteína de la invención se encuentra localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Asimismo, la proteína de la invención puede comprender secuencias de aminoácidos adicionales que desempeñen otras funciones. Ejemplos de dichas secuencias de aminoácidos adicionales incluyen, sin limitar a, péptidos señal y péptidos de secreción extracelular. En una realización particular, dichas secuencias adicionales están en el extremo amino-terminal.

En una realización particular de la proteína de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto, la proteína comprende, además, el dominio no catalítico de un CNF de *E. coli*, preferiblemente, en el extremo N-terminal de la proteína. En otra realización todavía más particular, el CNF de *E. coli* es CNF1, CNF2 o CNF3.

El término "CNF1" se refiere a la proteína tóxica llamada factor necrótico citotóxico 1 (en inglés *Cytotoxic Necrotizing Factor 1*) producida por *E. coli* que causa la alteración del citoesqueleto de actina de la célula huésped, favoreciendo la invasión bacteriana de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. La proteína CNF1 natural presenta la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 (correspondiente a la NCBI Reference Sequence: WP_021522232.1). CNF1 comprende un dominio de inyección (aminoácidos 1-719 de la secuencia SEQ ID NO: 3, aquí denominado "dominio no catalítico"), permitiendo la unión y penetración endosomal de la toxina, seguida por la

inyección intracitoplasmática de su dominio catalítico (aminoácidos 720-1014 de la secuencia SEQ ID NO: 3) responsable de la activación de la familia de las proteínas Rho GTPasas de las subfamilias RhoA, Rac y Cdc42.

5 SEQ ID NO: 3

1 MGNQWQQKYL LEYNELVSNF PSPERVVSDY IKNCFKTDLP WFSRIDPDNA YFICFSQNRS
 61 NSRSYTGWDH LGKYKTEVLT LTQAALINIG YRFDVFDDAN SSTGIYKTKS ADVFNEENEE
 121 KMLPSEYLFH LQKCDFAGVY GKTLSDYWSK YYDKFKLLLK NYYISSALYL YKNGELDERE
 181 YNFSMNALNR SDNISLLFFD IYGYASDIF VAKNNDKVML FIPGAKKPFL FKKNIADLRL
 10 241 TLKELIKDSD NKQLLSQHFS LYRQDGVSY AGVNSVLHAI ENDGNFNESY FLYSNKTLN
 301 KDVFDAIAIS VKKRSFSDGD IVIKSNSEAQ RDYALTILQT ILSMTPIFDI VVPEVSVPLG
 361 LGIITSSMGI SFDQLINGDT YEERRSAIPG LATNAVLLGL SFAIPLLISK AGINQEVLS
 421 VINNEGRTLN ETNIDIFLKE YGIAEDSISS TNLDDVKLKS SGQHVNIKLV SDEDNQIVAV
 481 KGSSLSGIYY EVDIETGYEI LSRRIYRTEY NNEILWTRGG GLKGGQPFDF ESLNIPVFFK
 15 541 DEPYSAVTGS PLSFINDDSS LLYPDTNPKL PQPTSEMDIV NYVKGSGSFG DRFVTLMRGA
 601 TEEEAWNIA S YHTAGGSTEE LHEILLGQGP QSSLGFTEYT SNVNSADAAS RRHFLVVIKV
 661 HVKYITNNNV SYVNHWAIPD EAPVEVLAVV DRRFNFPEPS TPPDISTIRK LLSLRYFKES
 721 IESTSKSNFQ KLSRGNIDVL KGRGSISSTR QRAIYPYFEA ANADEQQPLF FYIKKDRFDN
 781 HGYDQYFYDN TVGLNGIPTL NTYTGEIPSD SSSLGSTYWK KYNLTNETSI IRVSNSARGA
 20 841 NGIKIALEEV QEGKPVIIITS GNLSGCTTIV ARKEGYIYKV HTGTTKSLAG FTSTTGVKKA
 901 VEVLELLTKE PIPRVEGIMS NDFLVDYLSE NFEDSLITYS SSEKKTDSQI TIIRDNVSVF
 961 PYFLDNIPEH GFGTSATVLV RVDGNVVRS LSESYSLNAD VSEISVLKVF SKKF

Así, en una realización particular, el dominio no catalítico de CNF1 comprende una
 25 secuencia de aminoácidos con, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de
 identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 4. En otra realización más
 particular, el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende una secuencia de
 aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID
 NO: 4.

30

SEQ ID NO: 4

MGNQWQQKYL LEYNELVSNF PSPERVVSDY IKNCFKTDLP WFSRIDPDNA
 YFICFSQNRS NSRSYTGWDH LGKYKTEVLT LTQAALINIG YRFDVFDDAN
 SSTGIYKTKS ADVFNEENEE KMLPSEYLFH LQKCDFAGVY GKTLSDYWSK
 35 YYDKFKLLLK NYYISSALYL YKNGELDERE YNFSMNALNR SDNISLLFFD
 IYGYASDIF VAKNNDKVML FIPGAKKPFL FKKNIADLRL TLKELIKDSD
 KQQLLSQHFS LYRQDGVSY AGVNSVLHAI ENDGNFNESY FLYSNKTLN

ES 2 800 248 A1

KDVFDAIAIS VKKRSFSDGD IVIKSNSEAQ RDYALTILQT ILSMTPIFDI
VVPEVSVPLG LGIITSSMGI SFDQLINGDT YEERRSAIPG LATNAVLLGL
SFAIPLLLISK AGINQEVLS VINNEGRTLN ETNIDIFLKE YGIAEDSISS
TNLLDVKLKS SGQHVNIKLV SDEDNQIVAV KGSSLSGIYY EVDIETGYEI
5 LSRRIYRTEY NNEILWTRGG GLKGGQPFDF ESLNIPVFFK DEPYSAVTGS
PLSFINDDSS LLYPDTNPKL PQPTSEMDIV NYVKGSGSFG DRFVTLMRGA
TEEEAWNIAS YHTAGGSTEE LHEILLGQGP QSSLGFTEYT SNVNSADAAS
RRHFLVVIKV HVKYITNNNV SYVNHWAIPD EAPVEVLAVV DR

- 10 En otra realización más particular, el dominio no catalítico de CNF1 comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 10

MGNQWQQKYL LEYNELVSNF PSPERVSDY IKNCFKTDLP WFSRIDPDNA
15 YFICFSQNRS NSRSYTGWDH LGKYKTEVLT LTQAALINIG YRFDVFDDAN
SSTGIYKTKS ADVFNEENEE KMLPSEYLHF LQKCDFAGVY GKTLSDYWSK
YYDKFKLLLK NYYISSALYL YKNGELDERE YNFSMNALNR SDNISLFFFD
IYGYASDIF VAKNNDKVML FIPGAKKPFLL FKNIAIDLRL TLKELIKDSD
KQQLLSQHFS LYSRQDGVSY AGVNSVLHAI ENDGNFNESY FLYSNKTLN
20 KDVFDAIAIS VKKRSFSDGD IVIKSNSEAQ RDYALTILQT ILSMTPIFDI
VVPEVSVPLG LGIITSSMGI SFDQLINGDT YEERRSAIPG LATNAVLLGL
SFAIPLLLISK AGINQEVLS VINNEGRTLN ETNIDIFLKE YGIAEDSISS
TNLLDVKLKS SGQHVNIKLV SDEDNQIVAV KGSSLSGIYY EVDIETGYEI
LSRRIYRTEY NNEILWTRGG GLKGGQPFDF ESLNIPVFFK DEPYSAVTGS
25 PLSFINDDSS LLYPDTNPKL PQPTSEMDIV NYVKGSGSFG DRFVTLMRGA
TEEEAWNIAS YHTAGGSTEE LHEILLGQGP QSSLGFTEYT SNVNSADAAS
RRHFLVVIKV HVKYITNNNV SYVNHWAIPD EAPVEVLAVV DRRFNFPEPS
TPPDISTI

- 30 El término "CNF2" se refiere a la proteína tóxica llamada factor necrótico citotóxico 2 (en inglés *Cytotoxic Necrotizing Factor 2*) producida por *E. coli* que causa la alteración del citoesqueleto de actina de la célula huésped, favoreciendo la invasión bacteriana de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. La proteína CNF2 natural
35 Reference Sequence: WP_115209049.1). CNF2 comprende un dominio de inyección (aminoácidos 1-719 de la secuencia SEQ ID NO: 5, aquí denominado "dominio no

catalítico”), permitiendo la unión y penetración endosomal de la toxina, seguida por la inyección intracitoplasmática de su dominio catalítico (aminoácidos 720-1014 de la secuencia SEQ ID NO: 5) responsable de la activación de la familia de las proteínas Rho GTPasas de las subfamilias RhoA, Rac y Cdc42.

5

SEQ ID NO: 5

1 MNVQWQQKYL LEYNELVSNF PSPERVVSDY IRRCFKTDLP WFSQVDPDNT YFIQFSQSRS
 61 NSRSYTGWDH LGKYKTGVLT LTQAALINIG YHFDVFDDAN ASAGIYKTSS ADMFNEKNEE
 121 KMLPSEYLYF LKGCDFSGIY GRFLSDYWSK YYDKFKLLLK NYYISSALYL YKNGEIDEYE
 10 181 YNFSISALNR RDNISLFFFD IYGYSSDMF VAKNNERVML FIPGAKKPFLL FEKNIADLRI
 241 SLKNLIKEND NKQLLSQHFS LYSRQDGITY AGVNSVLNAI ENDGVFNESY FLYSNKRINN
 301 KDVFDAVAFS VKKRSFSDGD IVIKSNSEAQ RDYALTILQT ILSMTPIFDV AIPEVSVTLG
 361 LGIIASSMGI SFDQLINGDT YEERRSAIPG LATNAALLGL SFAIPFLISK AGTNQKILSR
 421 YTKHEIRTLN ETNIDMFLLE YGINKNSISE TKVLEVELKG SGQHVNIIVKL SDEDNKIVAV
 15 481 KGNSLSGIYY EVDIETGYEI SSRRIYRTEY NDKIFWTRGG GLKGGQSFDF ESLKLPPIFFK
 541 DEPYSAVPGS SLSFINDDSS LLYPNSTPKL PQPTPEMEIV NYVKRAGNSG ERLVTLMRGT
 601 TEEEAWNIAH YHTAGGSTEE LHEILLGQGP QSSSLGFTEYT SNINSADAAS RRHFLVVIKV
 661 QVKYINNNNV SHVNHWAIPD EAPVEVLAVV DRRFNFPEPS TPPNISIIHK LLSLRYFKEN
 721 IESTSRLNLQ KLNKRNIDIF KGRGSISSTR QRAIYPYFES ANADEQQPVF FYIKKNRFDD
 20 781 FGYDQYFYNS TVGLNGIPTL NTYTGEILSD ASSLGSTYWK KYNLNSETS IRVSNARGA
 841 NGIKIALEEV QEGKPVIIITS GNLSGCTTIV ARKGGYLYKV HTGTTIPLAG FTSTTGVKKA
 901 VEVFELLTNN PMPRVEGVMN NDFLVNYLAE SFDESLITYS SSEQKIGSKI TISRDNVSTF
 961 PYFLDNIPEK GFGTSVTILV RVDGNVIVKS LSESYSLNVE NSNISVLHVF SKDF

25 Así, en una realización particular, el dominio no catalítico de CNF2 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 6 (aminoácidos 1-719 de la secuencia SEQ ID NO: 5). En otra realización más particular, el dominio no catalítico de CNF2 de *E. coli* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad
 30 de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 6

SEQ ID NO: 6

1 MNVQWQQKYL LEYNELVSNF PSPERVVSDY IRRCFKTDLP WFSQVDPDNT YFIQFSQSRS
 61 NSRSYTGWDH LGKYKTGVLT LTQAALINIG YHFDVFDDAN ASAGIYKTSS ADMFNEKNEE
 35 121 KMLPSEYLYF LKGCDFSGIY GRFLSDYWSK YYDKFKLLLK NYYISSALYL YKNGEIDEYE
 181 YNFSISALNR RDNISLFFFD IYGYSSDMF VAKNNERVML FIPGAKKPFLL FEKNIADLRI
 241 SLKNLIKEND NKQLLSQHFS LYSRQDGITY AGVNSVLNAI ENDGVFNESY FLYSNKRINN
 301 KDVFDAVAFS VKKRSFSDGD IVIKSNSEAQ RDYALTILQT ILSMTPIFDV AIPEVSVTLG

ES 2 800 248 A1

361 LGIIASSMGI SFDQLINGDT YEERRSAIPG LATNAALLGL SFAIPFLISK AGTNQKILSR
421 YTKHEIRTLN ETNIDMFLEE YGINKNSISE TKVLEVELKG SGQHVNIIVKL SDEDNKIVAV
481 KGNSLSGIYY EVDIETGYEI SSRRIYRTEY NDKIFWTRGG GLKGGQSFDF ESLKLPFFK
541 DEPYSAPGS SLSFINDDSS LLYPNSTPKL PQPTPEMEIV NYVKRAGNSG ERLVTLMRGT
5 601 TEEEAWNIA R YHTAGGSTEE LHEILLGQGP QSSSLGFTEYT SNINSADAAS RRHFLVVIKV
661 QVKYINNNNV SHVNHWAIPD EAPVEVLAVV DRRFNFPEPS TPPNISIIHK LLSLRYFKE

El término “CNF3” se refiere a la proteína tóxica llamada factor necrótico citotóxico 3 (en inglés *Cytotoxic Necrotizing Factor 3*) producida por *E. coli*, y que comprende la
10 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 (correspondiente a la NCBI Reference Sequence: WP_063082538.1), en donde los aminoácidos 1-718 corresponden a un dominio de inyección que permite la unión y la penetración de la toxina (aquí denominado “dominio no catalítico”), y los aminoácidos 719-1013 corresponden al dominio catalítico responsable de la activación de la familia de proteína Rho.

15

SEQ ID NO: 7

1 MNTQWQQKYL LEYNDLVSKF PSPEKVTSY IKHKFKTDLP WFSRIDPKT YFIOFSQNR
61 NSRSYTGWDH LGKYKTDALT LTQAAIINIG YRFEVFDEAN ATAGIYTTNN ADLDFETNEA
121 KMLPSEYLYF LKNCDFAGLY NKALSDYWSK NHEKFKLLK NYYISSSLYL YKNNVISKDE
20 181 HEFTMKALNR DDNIELFSFD IYGYSSDIF GAKNDDRIML FIPGATNPFL FSENISHLRT
241 HLKELIKEND NRELLSRHFS LYDCQDGSTF YGVDVSLKEI VNGNFNESYF MYTYKFFNER
301 DVFDAISFSV QKRFSFDGDT IIKSNSEAQR DYALTIIQAI VSMIPVFDIT LPEVSVPLSM
361 GIIASSMGI SFDQLINGDT YEERRSAIPG ATNAVLLGIS FALPYLISKA SENKVILSQT
421 VSNEDSILNE TNIDNFLAEN GINKDDIPAN GILEVDIKKS GIPVNLVKIS DEDNQIVAVR
25 481 GSSQSGIYYE VDIETGYEIL SRRVYRTEYN NEIFWIRNGG LKGGQPFDFE NLDIPTFFVD
541 KPYSELASSP ELSFINDDSP LFPYVDSRL PKPTSEMDIS YYSSNFSSFA ENTVTLMRGA
601 TEEEAWNIA R YKTAGGSNKE LEEIFIGGP QANLSFTEYT SNIRSADAAS RRHFLVVINV
661 KIKYISNDNV LYANHWAIPD EAPVEVLAVV DRRFIFPEPP TPPKLSLIQK ISQRFFTEDI
721 DETSRINFQR LNSGNINVLK GRGSLSSKNQ RSIYLRFDV NADDLRPDEI YVKKDQFDDL
30 781 GYDRYFYNNA VGLDGSPTLN TYTGEFLTDP SLFGSLYWSK YNLTKTSII RVANSARGAN
841 GIRIALKEVQ ENKPVIIITNG NLSGCTTIVA RKGEYLYEVH TGTLEPLLGF TSTTGKKAV
901 EVLSTLAEQE IPSLAGTINN DFLVDFLAEN FDKSLVTYSS STLKPDSIIT ISRDNVSTFP
961 YYTDDIIHPG FGTSVTILVR IDDNTVVKSL SESYVTNADG SRISVFKVLS KDF

35 Así, en una realización particular, el dominio no catalítico de CNF3 comprende una secuencia de aminoácidos con, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 8 (aminoácidos 1-718 de la secuencia SEQ ID NO: 7). En otra realización más particular, el dominio no catalítico

de CNF3 de *E. coli* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO: 8

5 1 MNTQWQQKYL LEYN DLVSKF PSPEKVTS DY IKHKFKTDLP WFSRIDPKDT YFIQFSQNRS
 61 NSRSYTGWDH LGKYKTDALT LTQAAIINIG YRFEVFDEAN ATAGIYTTNN ADLFDETNEA
 121 KMLPSEYLYF LKNCDFAGLY NKALSDYWSK NHEKFKLLK NYYISSSLYL YKNNVISKDE
 181 HEFTMKALNR DDNIELFSFD IYGYSSDIF GAKNDDRIML FIPGATNPFL FSENISHLRT
 241 HLKELIKEND NRELLSRHFS LYDCQDGSTF YGVDSVLKEI VNGNFNESYF MYTYKKFNER
 10 301 DVFDAISFSV QKRFSFDGDT IIKSNSEAQR DYALTIIQAI VSMIPVFDIT LPEVSVPLSM
 361 GIIASSMGIS FDQLINGDTY EERRSAIPGV ATNAVLLGIS FALPYLISKA SENKVILSQT
 421 VSNEDSILNE TNIDNFLAEN GINKDDIPAN GILEVDIKKS GIPVNLVKIS DEDNQIVAVR
 481 GSSQSGIYYE VDIETGYEIL SRRVYRTEYN NEIFWIRNGG LKGGQPFDFE NLDIPTFFVD
 541 KPYSELASSP ELSFINDDSP LLFPYVDSRL PKPTSEMDIS YYSSNFSSFA ENTVTLMRGA
 15 601 TEEEAWNIAY YKTAGGSNKE LEEIFIGGGP QANLSFTEYT SNIRSADAAS RRHFLVVINV
 661 KIKYISNDNV LYANHWAIPD EAPVEVLAVV DRRFIFPEPP TPPKLSLIQK ISQRFFTE

Tal como se ha mencionado previamente, la proteína de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un
 20 sujeto, puede comprender secuencia de aminoácidos adicionales al dominio catalítico de la invención. Dichas secuencias de aminoácidos adicionales pueden ir unidos al dominio catalítico por su extremo amino- o carboxilo-terminal, y/o pueden estar unidos mediante un enlace covalente directo o través de un “linker”, “espaciador” o “enlazador” a través del cual se unen de forma covalente ambas secuencias.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “linker”, “espaciador” o “enlazador” hace referencia a una o más moléculas, por ejemplo, aminoácidos, o restos no peptídicos, tales como polietilén glicol, que pueden insertarse entre una o más dominios. Por ejemplo, secuencias espaciadoras pueden usarse para
 30 proporcionar un sitio de interés que facilite la manipulación de la proteína. También puede emplearse un espaciador para potenciar la expresión de la proteína, o para optimizar la estructura terciaria de la misma y asegurar una adecuada interacción de los componentes con la molécula diana. En una realización particular, el linker comprende la secuencia SEQ ID NO: 9 (QKIANR).

35 Asimismo, la proteína de la invención puede hallarse flanqueada de pequeños fragmentos polipeptídicos cuya presencia es necesaria y/o ventajosa para la expresión

del polipéptido en un vector adecuado o la actividad de la proteína. Dentro de éstos se encuentran tres aminoácidos en el extremo N-terminal (MNS, es decir Metionina-Asparagina-Serina), cuya secuencia se incluye para facilitar la iniciación de la traducción y acomodar sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción.

5 También se incluyen aquí secuencias que permiten una mejora en la purificación del polipéptido, tales como una cola de residuos de histidinas en el extremo C-terminal, cuando ésta, preferiblemente, consiste en, al menos, 6 residuos de histidina. Estos residuos flanqueantes de la proteína de la invención dan lugar a nuevas secuencias aminoácidas que comprenden la proteína de la invención y que mantienen la
10 actividad transglutaminasa que cataliza la poliaminación o deaminación de las GTPasas de la familia Rho, tal como RhoA, RhoB y RhoC, dando lugar a la activación de dicha familia de proteínas.

En otra todavía más realización particular, la proteína de la invención para su uso en el
15 tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto, comprende la secuencia SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 11

20 MGNOVQOQKYLLEYNELVSNFSPERVVSDYIKNCFKTDLPWFSTRIDPDNAYFICFSQNRS
NSRSYTGWDHLGKYKTEVLTTLTQAAALINIGYRFDVFDANSSTGIYKTKSADVFNEENEE
KMLPSEYLFHFLQKCDFAGVYGKTLSDYWSKYDYDKFKLLLKNYYISSALYLYKNGELDERE
YNFSMNALNRSDNISLLFFDIYGYASDIFVAKNNDKVMLFIPGAKKPFLLFKKNIADLRL
TLKELIKSDNKQLLSQHFSLYSRQDGVSYAGVNSVLHAIENDGNFNESYFLYSNKTLN
KDVFDAIAIAISVKKRSFSDGDIVIKSNSEAQRDYALTILOTLISMTPIFDIVVPEVSVPLG
25 LGIITSSMGISFDQLINGDTYEERRSAIPGLATNAVLLGLSFAIPLLIKAGINQEVLS
VINNEGRTLNETNIDIFLKEYGIAEDSISSTNLLDVKLKSSGQHVNIKLSDEDNQIVAV
KGSSLSGIYYEVDIETGYEILSRRIYRTEYNNEILWTRGGGLKGGQPFDFESLNIPVFFK
DEPYSAVTGSPLSFINDSSLLYPDTNPKLPQPTSEMDIVNYVKGSGSFGDRFVTLMRGA
TEEEAWNIASYHTAGGSTHEELHEILLGQGPQSSLGFTYTSNVNSADAASRRHFLVVIKV
30 HVKYITNNVSYVNHWAIPDEAPVEVLAVVDRRFNFPEPSTPPDISTIQKIANR**FLTENV**
AEISSINFRLNSGNINVLKGRGVFSSRRLREIYLRFDAANADELRPGDVYVKKTKFDSM
GYDSHFYNEGIGINGAPTLNTYTGEYVADSSSQGATYWLKYNLTNETSI IKVSN SARGAN
GIKIALEEIEENKPVVITSGTLTGCTVVFARKGEYFYAVHTGNSESLIGFTSTSGVAKAI
EVLSSLSELEVPALPDVINNNTLVEYLSDNFDSALISYSSSSLKPNSMINISRENVSTFS
35 **YTTDDIQLPSFGTSTILVRTNDNTVVRSLSESYTMNSNSKMMVFNVLQKDF**

Normal: SEQ ID NO: 10 (dominio no catalítico de la proteína de la invención)

Subrayado: SEQ ID NO: 9 (*linker*).

Negrita: SEQ ID NO: 2 (dominio catalítico de la proteína de la invención)

40

La presente invención se relaciona con una proteína, o la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, que comprende el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico (CNF), para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto.

5

Como entiende el experto en la materia, dicha proteína puede formar parte de una composición, más en concreto, de una composición farmacéutica formulada de forma adecuada para su administración a un sujeto, de aquí en adelante "composición de la invención".

10

Así, dicha composición farmacéutica, además de la proteína de la invención, puede comprender un soporte, un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

Por lo tanto, en una realización particular, la proteína de la invención, o la secuencia de nucleótidos que la codifica, está comprendida dentro de una composición farmacéutica la cual, en otra realización más particular, comprende además un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

Tal como se usa en la presente descripción, el término "soporte farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" o "solvente farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales soportes y vehículos en sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Los vehículos aceptables, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para el sujeto a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencilico; alquil para benos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 aminoácidos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la

35

glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contra-iones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

5

La proteína de la invención puede estar en la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente efectiva. El término "una cantidad terapéuticamente efectiva", en el contexto de la presente invención, se refiere a la cantidad del aptámero o complejo de la invención que se requiere para alcanzar una prevención, curación, 10 retraso, reducción de la gravedad de, o mejora de uno o más síntomas apreciables de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto. Es práctica de rutina para el experto en la materia calcular la cantidad terapéuticamente efectiva para un sujeto en función de su edad, sexo, peso, etc.

15 Las dosis usadas en la administración de la proteína de la invención pueden adaptarse en función de varios parámetros, y en particular en función de modo de administración usado, de la patología a tratar o, alternativamente, de la duración del tratamiento que se quiere. Por ejemplo, es ampliamente conocido en el estado de la técnica comenzar con una dosis del compuesto más bajas de lo que en realidad es necesario para 20 alcanzar el efecto terapéutico deseado, e ir incrementando poco a poco la dosis hasta conseguir dicho efecto. La dosis diaria de los productos puede variar en un amplio rango de valores que pueden variar, aproximadamente, desde 0,01 to 1,000 mg/adulto/día. Preferiblemente, las composiciones comprenden 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 250 o 500 mg del ingrediente activo (proteína de la 25 invención) para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto que va a ser tratado. Habitualmente, un medicamento comprende desde alrededor de 0,01 mg a 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente desde 1 mg a 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad efectiva de un fármaco es suministrada de forma ordinaria a una dosis desde 0,0002 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente, desde alrededor de 30 0,001 mg/kg to 7 mg/kg de peso corporal por día. En una realización particular, la cantidad terapéuticamente efectiva comprende entre 0,05 µg/g y 1 µg/g, preferiblemente, entre 0,125 µg/g y 0,0575 µg/g, más preferiblemente 0,22 µg/g.

Asimismo, la composición puede comprender vehículos que protegerán a la proteína 35 de la invención frente a una eliminación rápida del cuerpo, tales como una formulación

de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son ampliamente conocidos para el experto en la materia.

Tanto la proteína de la invención como la composición que la comprende, pueden administrarse al sujeto por cualquiera de las vías de administración conocidas en el estado de la técnica, tales como vía parenteral, oral, nasal, intraperitoneal, tópica, etc.

10 No obstante, en una realización particular, la proteína de la invención se administra por vía parenteral u oral.

En la presente invención se entiende por "vía parenteral", a aquella vía de administración en la que el principio activo atraviesa una o más capas de la piel o de las membranas mucosas mediante una inyección. Ejemplos de administración parenteral incluyen, sin limitar a, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, o administración subcutánea. La forma intravenosa de administración parenteral es generalmente preferida.

20 La composición farmacéutica proporcionada por la presente invención se puede adaptar para la administración parenteral con la adición de soluciones estériles, suspensiones o productos liofilizados en la forma de dosificación adecuada. La composición farmacéutica adecuada para uso inyectable incluye soluciones acuosas estériles o dispersiones o polvos estériles para la preparación de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática CremophorEM (BASF, Parsippany, NJ) o tampón fosfato salino (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y fluida para facilitar la inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina,

30

35 mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión

y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, 5 azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y/o gelatina.

10 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando la cantidad requerida del compuesto activo (por ejemplo, la proteína de la invención o la composición que la comprende) en un disolvente apropiado con uno o varios de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto 15 activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a 20 partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo. En una realización particular, dicha composición farmacéutica se administra a través de vía intravenosa. Excipientes adecuados pueden ser utilizados, tales como agentes de carga, agentes tamponantes o tensioactivos. Las formulaciones mencionadas se prepararán usando métodos estándar tales como los descritos o contemplados en las farmacopeas 25 española y estadounidense y textos de referencia similares.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas, a saber, las composiciones parenterales, en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. Forma de unidad de dosificación como 30 se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo (un aptámero o complejo de la invención) calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de 35 dosificación de la invención están dictadas por, y dependen directamente de, las

características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de sujetos.

5 Adicionalmente, la composición que comprende la proteína de la invención también puede administrarse por vía oral. Formulaciones adecuadas para la administración de la proteína por vía oral incluyen, sin limitar a, comprimidos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral pueden
10 prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina, aromatizante. Agentes tales como menta, aceite de gaulteria o cereza, colorantes y conservantes para proporcionar preparaciones
15 farmacéuticamente elegantes y sabrosas. Los comprimidos que contienen compuestos de la invención en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos también pueden fabricarse por métodos conocidos. Los excipientes utilizados pueden ser, por ejemplo, (1) diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; (2) agentes de granulación y desintegración tales como
20 almidón de maíz, almidón de patata o ácido algínico; (3) agentes aglutinantes tales como goma de tragacanto, almidón de maíz, gelatina o acacia, y (4) agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y,
25 por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo temporal tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. En algunos casos, las formulaciones para uso oral pueden estar en forma de cápsulas de gelatina dura en las que los compuestos de la invención se mezclan con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio,
30 fosfato de calcio o caolín. También pueden estar en forma de cápsulas de gelatina blanda en las que los compuestos de la invención se mezclan con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Los conservantes preferidos que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas
35 incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, clorobutanol, timerosal, acetato

fenilmercúrico y nitrato fenilmercúrico. Un tensioactivo preferido es, por ejemplo, Tween 80. Estos vehículos incluyen, pero no se limitan a, alcohol polivinílico, povidona, hidroxipropil metil celulosa, poloxámeros, carboximetil celulosa, hidroxietilcelulosa ciclodextrina y agua purificada.

5

La presente invención se relaciona con una proteína, o la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, que comprende el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico (CNF), para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto.

10

En la presente invención se entiende por "septicemia" o "sepsis" a la presencia de microorganismos en la sangre de un sujeto como consecuencia de una infección grave, en donde el microorganismo interfiere con el funcionamiento normal de la célula huésped, lo que puede llevar a heridas crónicas, edemas, gangrenas, pérdida de la extremidad infectada e incluso la muerte.

15

Ejemplos de microorganismos que pueden infectar a un sujeto y producir una septicemia incluyen, sin limitarse a, protozoos parásitos, virus, hongos y bacterias.

20

En una realización particular, la infección es producida por una bacteria. En este caso, la septicemia también recibe el nombre de bacteremia. En una realización particular, la bacteria es una bacteria extracelular. En otra realización particular, la bacteria se selecciona del grupo que consiste en *Bordetella*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Haemophilus*,
25 *Helicobacter*, *Legionella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* y *Yersinia*. En otra realización particular, la bacteria es una bacteria resistente a antibióticos. Ejemplos de bacterias resistente a antibióticos incluyen, sin limitarse a, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, de sus siglas en inglés *methicillin-resistant S. aureus*),
30 *S. aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad (CA-MRSA, de sus siglas en inglés *community acquired MRSA*), *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA, de sus siglas en inglés *vancomycin-resistant S. aureus*), *S. aureus* resistente intermedio a vancomicina (VISA, de sus siglas en inglés *vancomycin-intermediate S. aureus*) y *S. aureus* resistente a glicopéptido (GISA, de sus siglas en inglés *glycopeptide-resistant*
35 *S. aureus*).

En una realización particular, la infección es producida por un protozoo parásito. En una realización particular, el protozoo parásito se selecciona del grupo que consiste en *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Giardia*, *Trichomonas* y

5 *Babesia*.

El sujeto a ser tratado con la proteína de la invención puede ser cualquier individuo susceptible de sufrir una infección por alguno de los microorganismos citados anteriormente, o que ha sido diagnosticado con una patología asociada con una

10 infección por cualquier de dichos microorganismos. El término "sujeto", tal como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a cualquier animal, preferiblemente un mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates, y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores como ratas y ratones. En una

15 realización particular, el sujeto es un ser humano de cualquier sexo, edad o raza.

Asimismo, la presente invención también contempla la prevención y/o el tratamiento de edemas asociados a septicemia en un sujeto. En la presente invención se entiende por "edema" a la hinchazón causada por la acumulación de líquido en los tejidos del

20 cuerpo.

En otra realización particular, la proteína de la invención, o la secuencia de nucleótidos que la codifica, está comprendida dentro de un kit.

25 Como se ha descrito al comienzo de la presente descripción, la invención se relaciona con una proteína, o la secuencia de nucleótidos que codifica dicha proteína, que comprende el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY), para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto. Por lo tanto, en la

30 presente invención también está contemplado como un aspecto inventivo una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY), de aquí en adelante "secuencia de nucleótidos de la invención", para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un

35 sujeto (de aquí en adelante "uso de la secuencia de nucleótidos de la invención").

Como se deriva de la lectura de la presente descripción, todas las realizaciones particulares explicadas y definidas para la proteína de la invención en párrafos anteriores son aplicables a la secuencia de nucleótidos de la invención.

5 Así, en una realización particular, el dominio catalítico de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención para el uso antes definido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 2. En una realización más particular, dicho el dominio catalítico comprende una secuencia de
10 aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2.

En otra realización particular, el dominio catalítico de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención se encuentra localizado en el extremo
15 carboxilo terminal de la proteína.

En otra realización particular, la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención comprende, además, el dominio no catalítico de CNF de *Escherichia coli*, preferiblemente, el dominio no catalítico de CNF1, CNF2 o CNF3 de *E. coli*.

20 En una realización más particular, el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* de la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 4. En otra
25 realización todavía más particular, dicho dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 4. En otra realización aún más particular, el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende la secuencia SEQ ID NO: 10.

30 En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención codifica una proteína que comprende la proteína comprende la secuencia SEQ ID NO: 11.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención es administrada de forma parenteral o de forma intraperitoneal.

35

En otra realización particular, el sujeto al que se le administra la secuencia de nucleótidos de la invención es un mamífero, preferiblemente, un ser humano.

5 En otra realización particular del uso de la secuencia de nucleótidos de la invención, la septicemia es producida por una bacteria seleccionada del grupo que consiste Bordetella, Brucella, Campylobacter, Chlamydia, Clostridium, Corynebacterium, Enterococcus, Escherichia, Francisella, Haemophilus, Helicobacter, Legionella, Listeria, Mycobacterium, Neisseria, Pseudomonas, Rickettsia, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, Vibrio and Yersinia.

10

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia, está comprendida dentro de una composición farmacéutica que, en otra realización más particular, comprende, además, un excipiente o vehículo farmacéuticamente
15 aceptable.

Finalmente, en otra realización particular, la secuencia de nucleótidos de la invención para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a septicemia, está comprendida dentro de un kit.

20

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la
25 invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 Figura 1. RhoC Flare.sc está activo en la periferia celular. Se aplicó un mapa de color para el rango visualizado de los valores de la relación YFP / CFP. Barra de escala, 20 μ m. (B) Diagrama de caja que detalla las diferencias en la emisión media de células vivas no estimuladas que expresan RhoC Flare.sc en el centro celular y la periferia celular. Una representación esquemática de la estructura y el principio de acción de
35 RhoC FLARE.sc se muestran en el lado derecho. valor $p = 5,6 \cdot 10^{-11}$, $n = 309$ células

de 5 experimentos diferentes. (C) Efecto de la inhibición individual y triple mediada por ARNip de RhoA, RhoB y RhoC sobre las proteínas de la unión endotelial y la fosforilación de la cadena ligera de miosina (P-MLC). (D) Efecto de la inhibición individual y triple de RhoA, RhoB y RhoC mediada por ARNip sobre los niveles de

5 proteína VE-cadherina y su distribución observada por microscopía confocal. (E) Efecto de cinco ARNsi diferentes dirigidos a RhoC en los niveles de proteína RhoC y VE-cadherina. Notar la correlación lineal entre ambos niveles de proteína en el gráfico de la derecha. (F) Los resultados de impedancia obtenidos con ECIS pueden modelarse matemáticamente y separarse en valores específicos, que reflejan la

10 contribución de varios parámetros fisiológicos a los cambios en la función de la barrera. La inhibición de RhoC disminuyó específicamente los valores de Rb, que miden la permeabilidad paracelular, pero tuvo un efecto menor sobre los valores alfa, que reflejan las interacciones célula-matriz y la capacitancia de la membrana celular.

15 Figura 2. (A) Act-II activa la subfamilia RhoA. Ensayos “pull-down” con conjugados GST con el dominio de unión a Rho (RBD) del efector Rhotekin de la subfamilia RhoA. La actividad de los tres miembros de la subfamilia RhoA se incrementa después de 3 horas en presencia de la Act-II. (B) Células sin tratar (Untr; Untreated cells). Act-II activa RhoC en el borde de las células endoteliales. Se aplicó un mapa de color para

20 el rango visualizado de los valores de la relación YFP/CFP en presencia o ausencia (no estimulado) de Act-II. Barra de escala, 20 μ m. Diagrama de caja que detalla las diferencias en la emisión media de células vivas, sin estimular o estimuladas con Act-II que expresan RhoC Flare.sc. Cuantificación de la relación YFP/CFP en el centro de la célula, la periferia de la célula (uniones) y la célula completa. (C) Act-II aumenta la

25 tinción de VE-cadherina en las uniones. Imágenes confocales de VE-cadherina que muestran el efecto del Act-II en la distribución de VE-cadherina. El índice de unión es la relación entre las intensidades de tinción de unión (membrana) y total. (D) Las proteínas de superficie de HUVEC en presencia o ausencia de Act-II se marcaron con sulfo-NHS-biotina. Las proteínas biotiniladas se aislaron mediante pull-down

30 (superficie) y se compararon con las proteínas en el lisado (total) mediante inmunotransferencia. Act-II aumenta la VE-cadherina total y de superficie. Tenga en cuenta que en ausencia de sulfo-NHS-biotina no se detecta VE-cadherina en la fracción “pull-down” (superficie) de las células en presencia de Act-II. (E) Efecto de la Act-II en TEER. *, $p < 0.05$.

35

Figura 3. (A) Diseño experimental para inducir respuestas inflamatorias intradérmicas locales con VEGF y LPS en ratones no tratados o en ratones previamente inyectados con Act-II en el peritoneo. (B) El ensayo de “Miles” (Radu *et al.* 2013, J Vis Exp. 16(73): e50062. doi: 10.3791/50062) se realizó como se describe y los cambios en el azul de Evans filtrado se cuantificaron en las áreas inyectadas con LPS (piel) y VEGF (piel) con respecto a las áreas inyectadas con solución salina. Como controles, también se cuantificó el azul de Evans en hígado, pulmón y riñón (fuga vascular).

Figura 4. (A) Diseño experimental para inducir una respuesta inflamatoria sistémica mediante inyección intraperitoneal de solución salina (control negativo), LPS + solución salina o LPS + Act-II. Gráficos de barras: El ensayo de “Miles” se realizó como se describe y los cambios en la cantidad de azul de Evans se cuantificaron en los órganos indicados, hígado, pulmón y riñón. (B, C) Antes de la inyección de Evans Blue, se tomaron muestras de sangre antes y después de la inyección intraperitoneal de LPS y se midieron los niveles de IL-6 y TNF (B) y glucosa (C).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: La subfamilia RhoA de GTPasas es activa en la periferia celular, controla la expresión de las cadherinas endoteliales y la función de la barrera endotelial.

En el presente ejemplo se demuestra, en primer lugar, que RhoC es activo preferentemente en la periferia de las células endoteliales (Figuras 1A y 1B), lo que sugiere que esta GTPasa puede regular los contactos célula-célula. Para abordar esta cuestión, se realizó un análisis FRET con RhoC-FLARE, que consistió en utilizar el dominio de unión a Rho de ROCK conjugados con la proteína monomérica fluorescente Cerulean y unidos a la proteína monomérica fluorescente Venus, conjugados a RhoC de longitud completa (Zawistowski *et al.* 2013. PLoS One. Nov 5; 8(11):e79877). Tras la activación de RhoC, RhoC-GTP se une al dominio ROCK y las dos proteínas fluorescentes se acercan, lo que aumenta la FRET. RhoC-FLARE FRET se detectó principalmente en la periferia celular, cerca de las uniones celulares. De hecho, un examen de expresión de proteínas de unión célula-célula, reveló que la

expresión de las proteínas de la subfamilia RhoA es necesaria para la expresión de cadherina clásica normal en células endoteliales humanas y para mantener los niveles de actomiosina (Figura 1C). La expresión de VE-cadherina está regulada preferentemente por la expresión del gen RhoC (Figuras 1D y 1E). Por lo tanto, se requiere la expresión RhoC de unión para mantener la integridad de la barrera endotelial humana (Figura 1F).

Ejemplo 2: El factor necrotizante de la citotoxina (CNF) (Act-II) activa el endotelio endógeno RhoA, RhoB y RhoC, estabiliza las uniones adherentes y mejora la función de barrera *in vitro*.

Los factores necróticos citotóxicos (CNF) son toxinas bacterianas que inducen la desamidación de un residuo de glutamina en la región Switch II de las Rho GTPasas. Algunas CNFs, como la CNF1, de *Escherichia Coli*, inducen la desamidación de diversas Rho GTPasas, como la subfamilia Rac, RhoA y Cdc42. Algunos otros, como CNFy de *Yersinia pseudotuberculosis* son específicos para la subfamilia RhoA. En este caso se utilizó un activador de subfamilia RhoA disponible en el mercado que consiste en un dominio catalítico de toxina CNF conjugado a un péptido de penetración celular, llamado Rho Activator II (Act-II) (Cytoskeleton, Inc.), que previamente se había demostrado que activaba específicamente RhoA, pero no Rac1 y Cdc42. Por espectrometría de masas, se encontró que Act-II (SEQ ID NO: 11) es una proteína quimérica, que comprende el dominio N-terminal de CNF1 (SEQ ID NO: 4) y el dominio catalítico, C-terminal, de CNFy (SEQ ID NO: 2 correspondiente a los aminoácidos 716-1014 de la secuencia SEQ ID NO: 1), que confiere la especificidad para activar RhoA GTPasas. En células endoteliales vasculares humanas, Act-II activó RhoA, RhoB y RhoC (Figura 2A). Posteriormente, se analizó el área subcelular en la que Act-II activa RhoC, el principal regulador de la función de la barrera endotelial y la expresión de VE-cadherina. Para solucionar esto, realizamos nuevamente el análisis FRET con RhoC-FLARE. Los experimentos de FRET revelaron que Act-II aumentaba la activación de Rho principalmente en los bordes de las células (Figura 2B). De hecho, Act-II incrementó la localización de la unión de la cadherina VE (Figuras 2C y 2D) y mejoró significativamente la resistencia transendotelial endotelial *in vitro* (Figura 2E). Por lo tanto, Act-II activa RhoC en la periferia celular y preserva las uniones mediadas por VE-cadherina en células endoteliales humanas.

35

Ejemplo 3: Act-II previene el aumento de la permeabilidad en respuesta a mediadores inflamatorios *in vivo*.

Teniendo en cuenta los resultados *in vitro*, se presentan aquí resultados que indican
 5 que el Act-II fortalece la barrera endotelial a nivel vascular, lo que la hace más resistente a los mediadores que causan la fuga vascular. Ratones CD1 fueron inyectados por vía intraperitoneal con solución salina o 0,175 µg/g de Act-II. Los ratones CD1 son derivados de un grupo de ratones Swiss desarrollado por el Anti-Cancer Center en Lausanne, Suiza. Estos ratones fueron importados a los Estados
 10 Unidos en 1926 y de ahí se extendieron al resto del mundo como modelo animal para estudios genéticos, de toxicología, y farmacología y envejecimiento. Los ratones CD1 responden a estímulos inflamatorios como el LPS y son utilizados como modelos para estudios de sepsis (Pirianov et al., 2015. *Reproduction*, 150(4):269-277; Ando et al., 2000, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294: 1043-1046;
 15 Yamamoto et al. 2011. *Journal of Immunology*, 186(5):3248-3257). 3,5 horas más tarde de la inyección intraperitoneal, se realizó un ensayo de Miles (Miles AA, Miles EM. 1952. *The Journal of physiology*. 118:228-257). En resumen, se llevó a cabo una inyección retro-orbital de 150 µL de Evans Blue (Merck) al 0,5% p/v y, 15 minutos más tarde, 20 µg de LPS (1 µg / µL) y 50 µL. Se inyectaron por vía intradérmica µg de
 20 VEGF (2,5 ng / µL) en la piel posterior. 15 minutos después de la inyección, los ratones se sacrificaron, y se recogieron y pesaron parches de piel de 5 mm de diámetro. También se recogieron 100 mg de hígado, pulmón y riñón de cada ratón. Todas las muestras de tejido se incubaron con formamida a 55 °C durante 48 horas. El Evans Blue extraído se midió espectrofotométricamente a 595 nm, respectivamente,
 25 normalizado al peso del tejido, y se expresó como transformación con respecto a los valores colorimétricos obtenidos tras la inyección de control de solución salina en cada ratón. Los ratones inyectados con Act-II mostraron un reducido aumento de la permeabilidad con la inyección de LPS y VEGF (Figuras 3A y 3B).

30 **Ejemplo 4: Act-II previene el edema en respuesta a la inyección intraperitoneal de LPS como un modelo experimental de sepsis.**

Afirmamos que la protección de la barrera endotelial mediante la inyección de Act-II tiene aplicaciones para enfermedades que provocan daño endotelial, como la sepsis.
 35 La infección bacteriana sistémica causa la interrupción de la barrera endotelial, la

pérdida de la expresión de la VE cadherina, el edema orgánico y el fallo orgánico. Con el fin de simular la fase aguda de la sepsis 5, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 50 µg / g de LPS o solución salina. Un subconjunto de ratones inyectados con LPS también se inyectó con 0,175 µg/g o 0,525 µg/g de Act-II. 17

5 horas más tarde, se realizó una inyección retro-orbital de 150 µL 0,5% p/v de Evans Blue (Merck). 30 minutos después de la inyección, los ratones se sacrificaron y se recogieron 100 mg de hígado, pulmón y riñón de cada ratón. Las muestras de tejido se incubaron con formamida a 55 ° C durante 48 horas. El azul de Evans extraído se midió espectrofotométricamente a 595 nm, respectivamente y se normalizó al peso del

10 tejido (Figura 4A). Los ratones inyectados con LPS y Act-II mostraron entre 50 y 70% de reducción del aumento de la permeabilidad, en los tres órganos analizados, en comparación con los valores colorimétricos de animales inyectados solo con LPS. Antes de la inyección de Evans Blue, se tomaron muestras de sangre de cada ratón y se midieron los niveles de citoquinas inflamatorias IL-6 y TNF (Figura 4B) y glucosa

15 (Figura 4C). Los resultados demuestran que la activación de la subfamilia RhoA con Act-II *in vivo* previene la interrupción vascular en un modelo experimental de sepsis y disminuye las citoquinas inflamatorias en la sangre. Por lo tanto, afirmamos que la inyección de Act-II en pacientes con sepsis puede prevenir el edema asociado a esta patología.

20

REIVINDICACIONES

1. Una proteína que comprende el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) para usarla en el tratamiento y/o la prevención
5 de septicemia y/o edemas asociados a septicemia en un sujeto.
2. Proteína para usarla según la reivindicación 1, en el que el dominio catalítico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 2.
10
3. Proteína para usarla según la reivindicación 2, en el que el dominio catalítico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 15 4. Proteína para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el dominio catalítico se encuentra localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína.
5. Proteína para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la
20 proteína comprende, además, el dominio no catalítico de CNF de *Escherichia coli*, preferiblemente, el dominio no catalítico de CNF1, CNF2 o CNF3 de *E. coli*.
6. Proteína para usarla según la reivindicación 5, en el que el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de
25 secuencia de, al menos, el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 4.
7. Proteína para usarla según la reivindicación 6, en el que el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de
30 secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 4.
8. Proteína para usarla según la reivindicación 7, en el que el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende la secuencia SEQ ID NO: 10.

9. Proteína para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la proteína comprende la secuencia SEQ ID NO: 11.
10. Proteína para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que
5 la proteína es administrada de forma parenteral o de forma intraperitoneal.
11. Proteína para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el sujeto es un mamífero, preferiblemente, un ser humano.
- 10 12. Proteína para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la septicemia es producida por una bacteria seleccionada del grupo que consiste Bordetella, Brucella, Campylobacter, Chlamydia, Clostridium, Corynebacterium, Enterococcus, Escherichia, Francisella, Haemophilus, Helicobacter, Legionella, Listeria, Mycobacterium, Neisseria, Pseudomonas, Rickettsia, Salmonella, Shigella,
15 Staphylococcus, Streptococcus, Vibrio and Yersinia.
13. Proteína para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha proteína está comprendida dentro de una composición farmacéutica.
- 20 14. Proteína para usarla según la reivindicación 13, en donde la composición farmacéutica comprende, además, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Proteína para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en
25 donde la proteína está comprendida dentro de un kit.
16. Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende el dominio catalítico de un factor necrótico citotóxico de *Yersinia pseudotuberculosis* (CNFY) para usarla en el tratamiento y/o la prevención de septicemia y/o edemas asociados a
30 septicemia en un sujeto.
17. Secuencia de nucleótidos para usarla según la reivindicación 1, en el que el dominio catalítico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la
35 secuencia SEQ ID NO: 2.

18. Secuencia de nucleótidos para usarla según la reivindicación 17, en el que el dominio catalítico comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2.

5

19. Secuencia de nucleótidos para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el dominio catalítico se encuentra localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína.

10 20. Secuencia de nucleótidos para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que la proteína comprende, además, el dominio no catalítico de CNF de *Escherichia coli*, preferiblemente, el dominio no catalítico de CNF1, CNF2 o CNF3 de *E. coli*.

15 21. Secuencia de nucleótidos para usarla según la reivindicación 20, en el que el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de, al menos, el 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 4.

20 22. Secuencia de nucleótidos para usarla según la reivindicación 21, en el que el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 4.

25 23. Secuencia de nucleótidos para usarla según la reivindicación 22, en el que el dominio no catalítico de CNF1 de *E. coli* comprende la secuencia SEQ ID NO: 10.

24. Secuencia de nucleótidos para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en el que la proteína comprende la secuencia SEQ ID NO: 11.

30 25. Secuencia de nucleótidos para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 24, en el que la secuencia de nucleótidos es administrada de forma parenteral o de forma intraperitoneal.

35 26. Secuencia de nucleótidos para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 25, en el que el sujeto es un mamífero, preferiblemente, un ser humano.

27. Secuencia de nucleótidos para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 26, en el que la septicemia es producida por una bacteria seleccionada del grupo que consiste Bordetella, Brucella, Campylobacter, Chlamydia, Clostridium, 5 Corynebacterium, Enterococcus, Escherichia, Francisella, Haemophilus, Helicobacter, Legionella, Listeria, Mycobacterium, Neisseria, Pseudomonas, Rickettsia, Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Streptococcus, Vibrio and Yersinia.

28. Secuencia de nucleótidos para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 10 26 a 27, en donde la secuencia de nucleótidos está comprendida dentro de una composición farmacéutica.

29. Secuencia de nucleótidos para usarla según la reivindicación 28, en donde la 15 composición farmacéutica comprende, además, un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

30. Secuencia de nucleótidos para usarla según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 29, en donde la secuencia de nucleótidos está comprendida dentro de un kit.

20

DIBUJOS

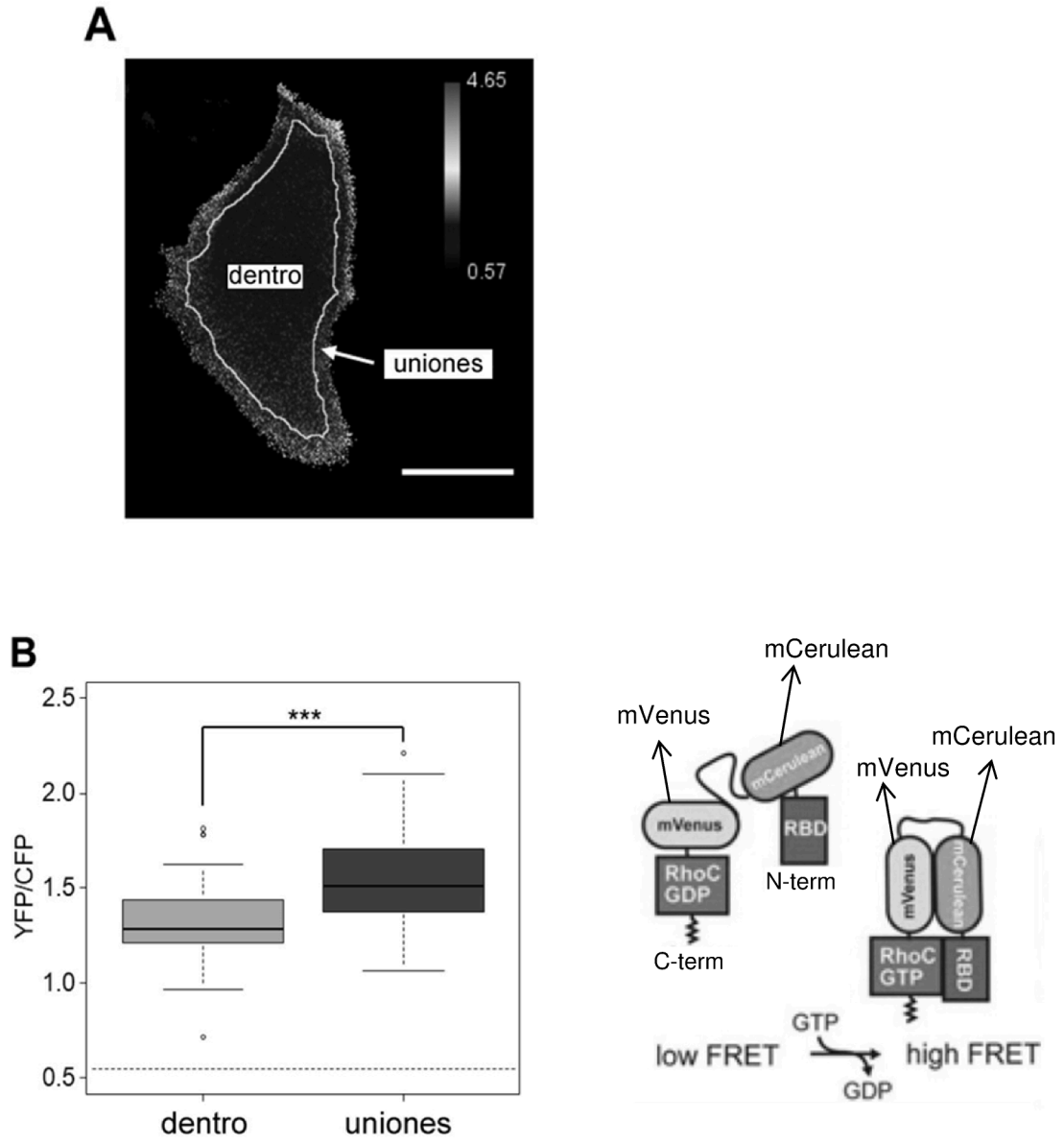


FIG. 1

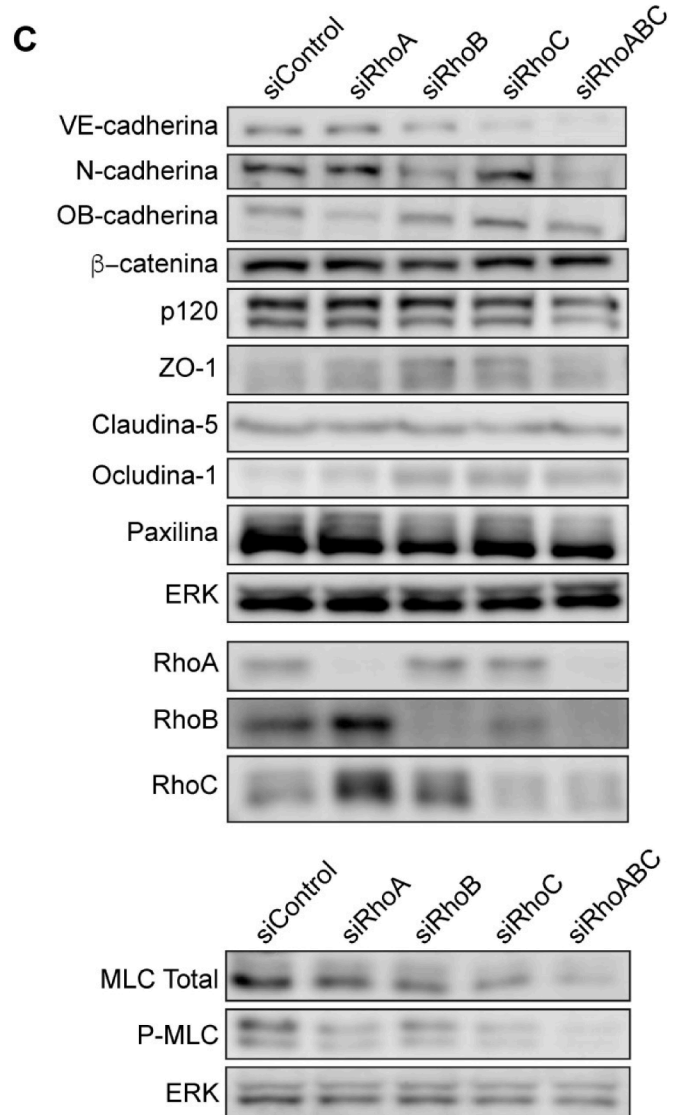


FIG: 1 (continuación)

C

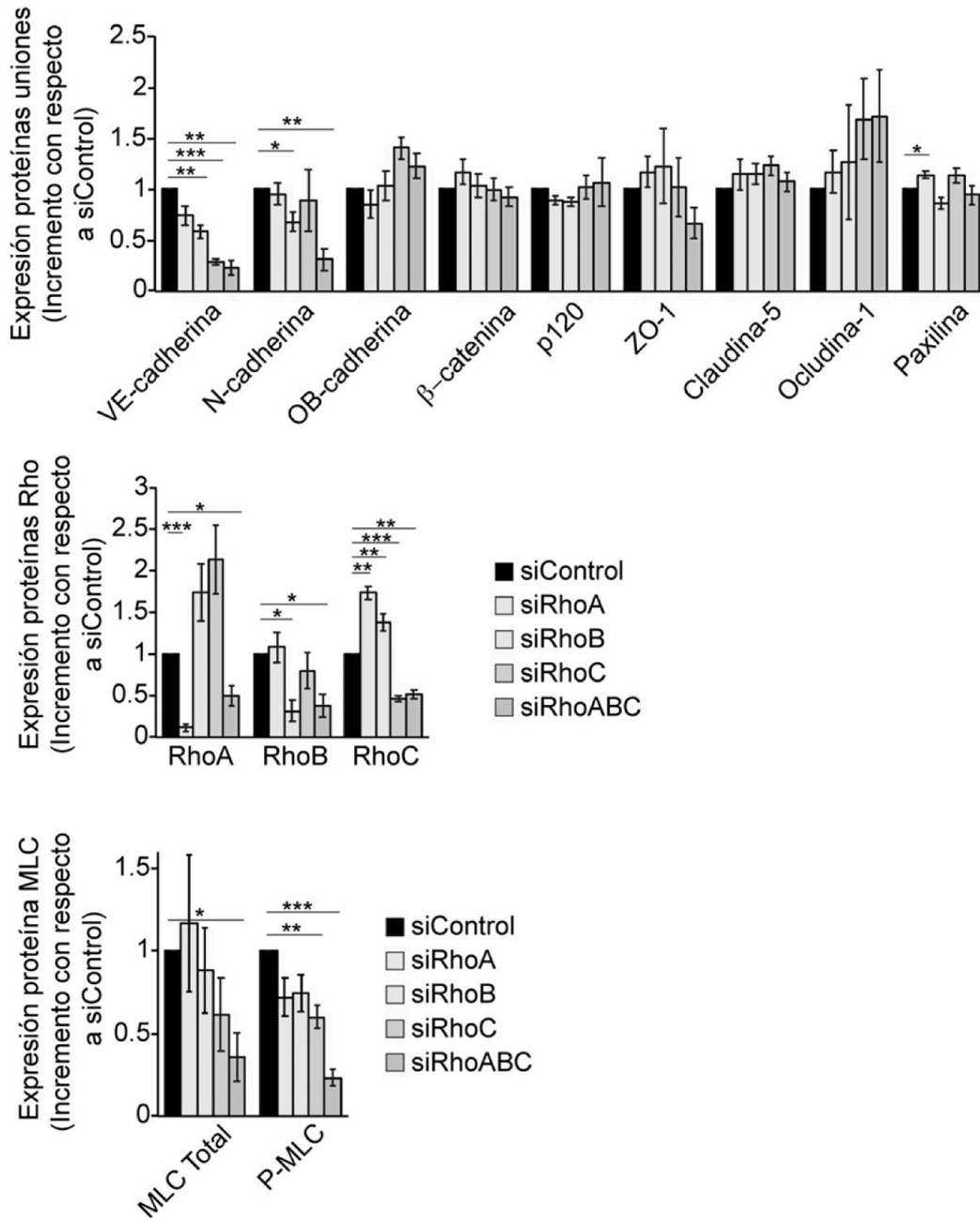


FIG. 1 (continuación)

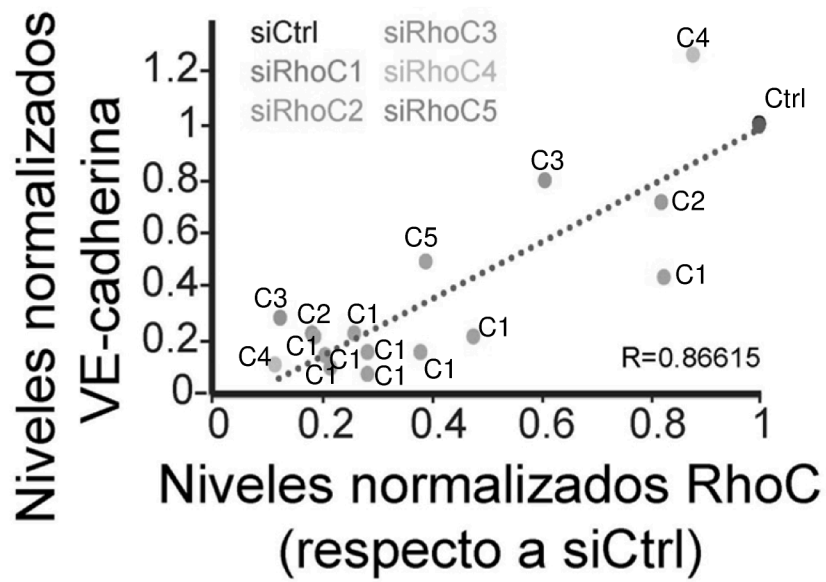
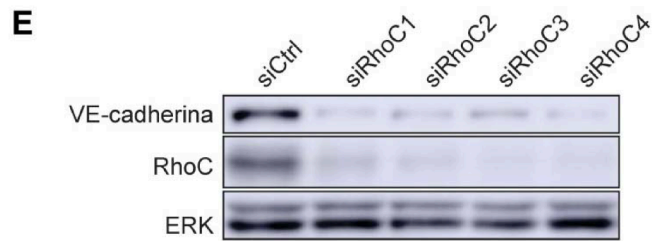
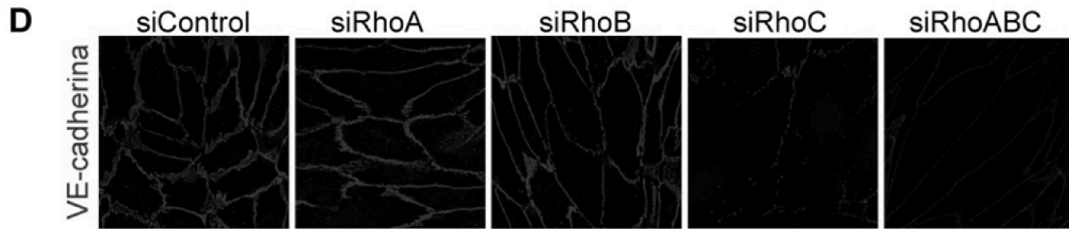


FIG. 1 (continuación)

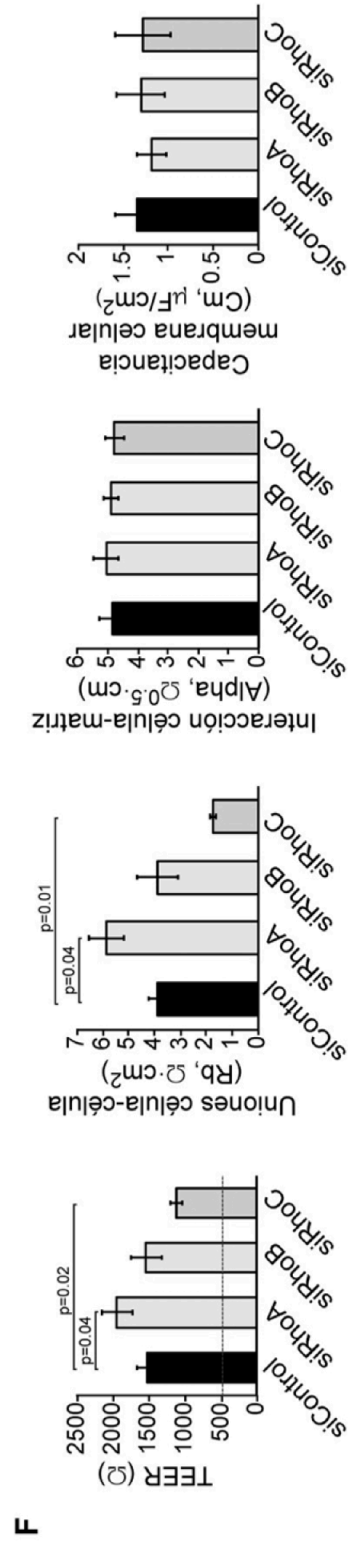
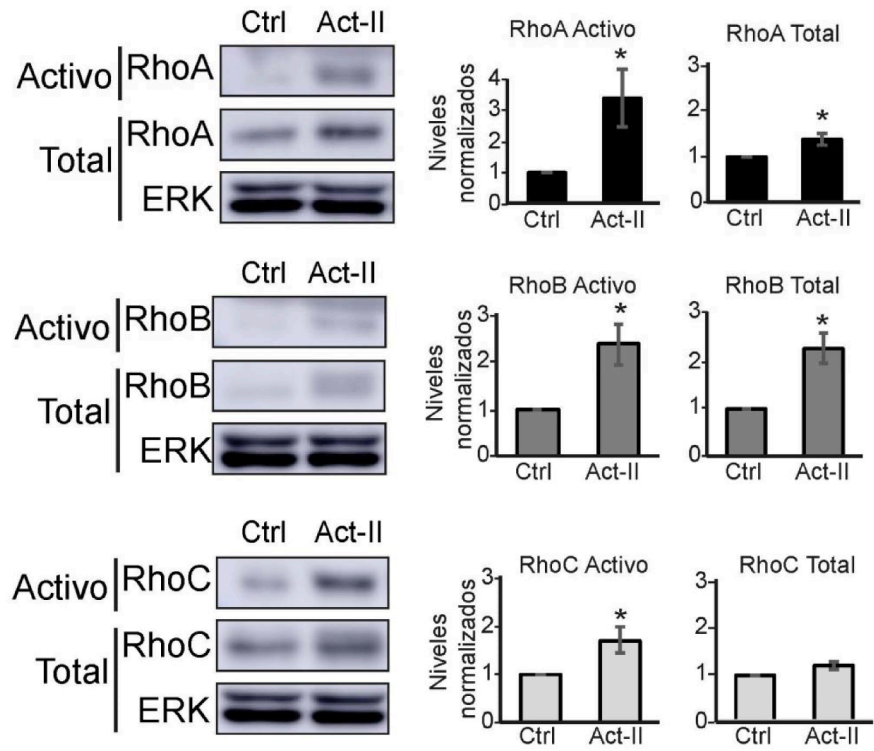


FIG. 1 (continuación)

A



B

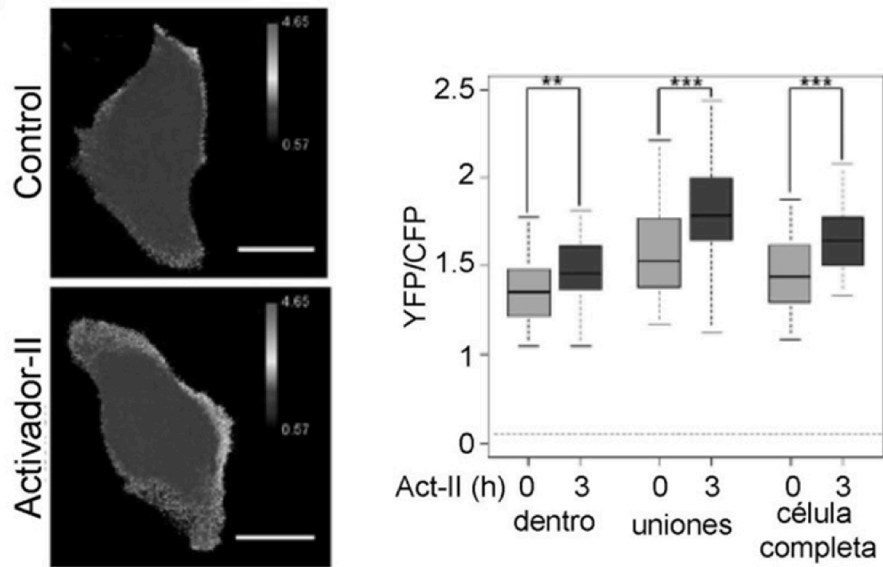


FIG. 2

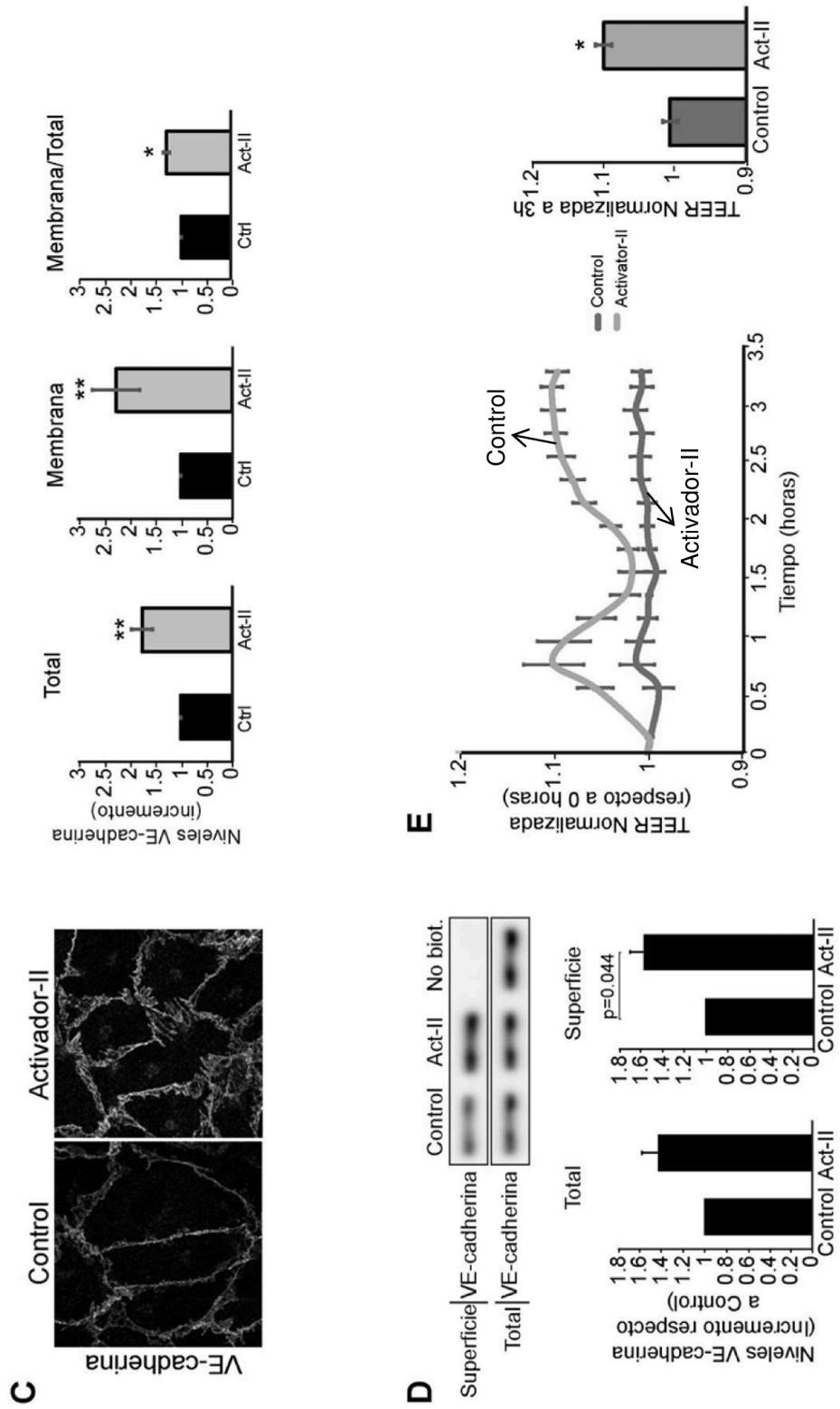


FIG. 2 (continuación)

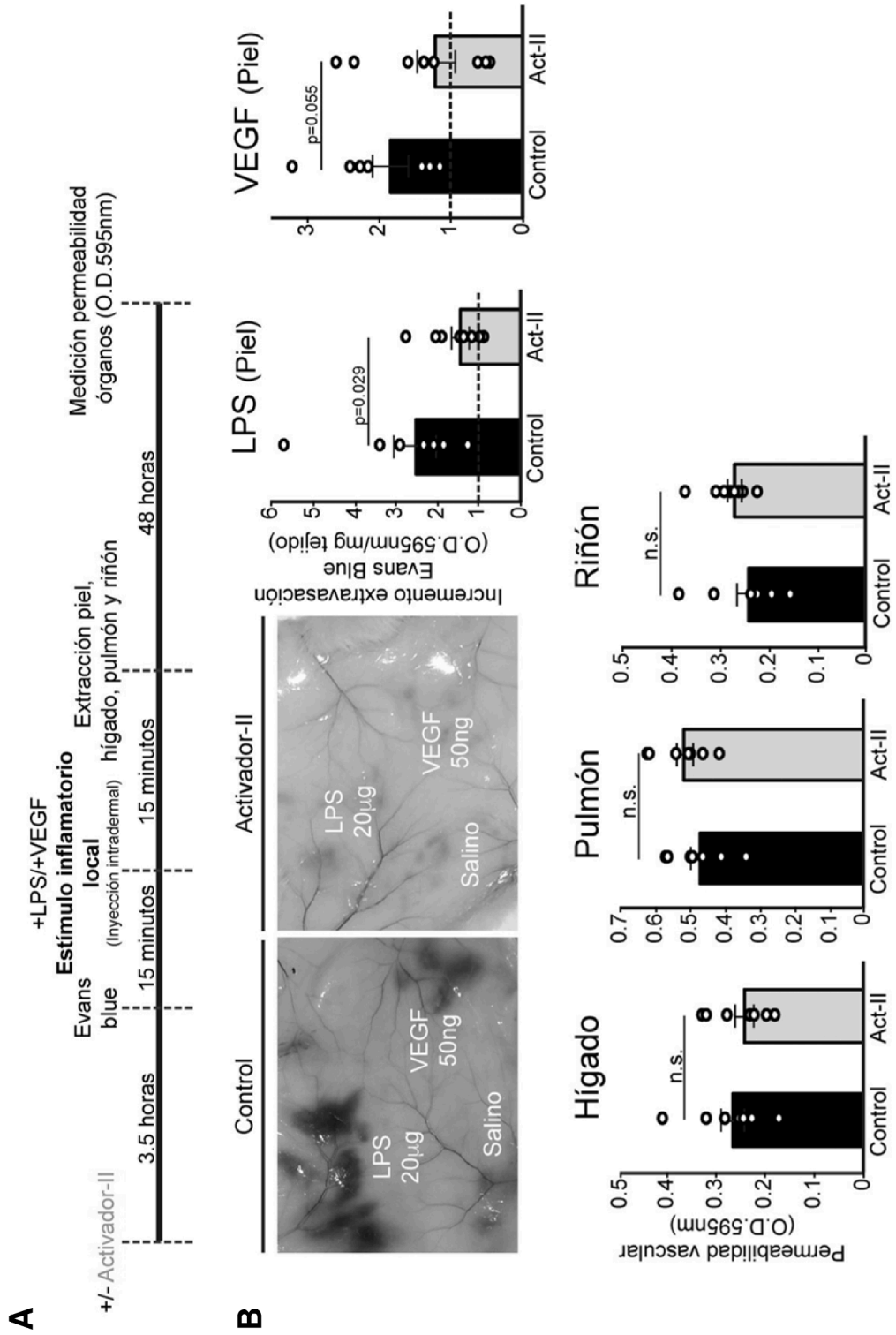


FIG. 3

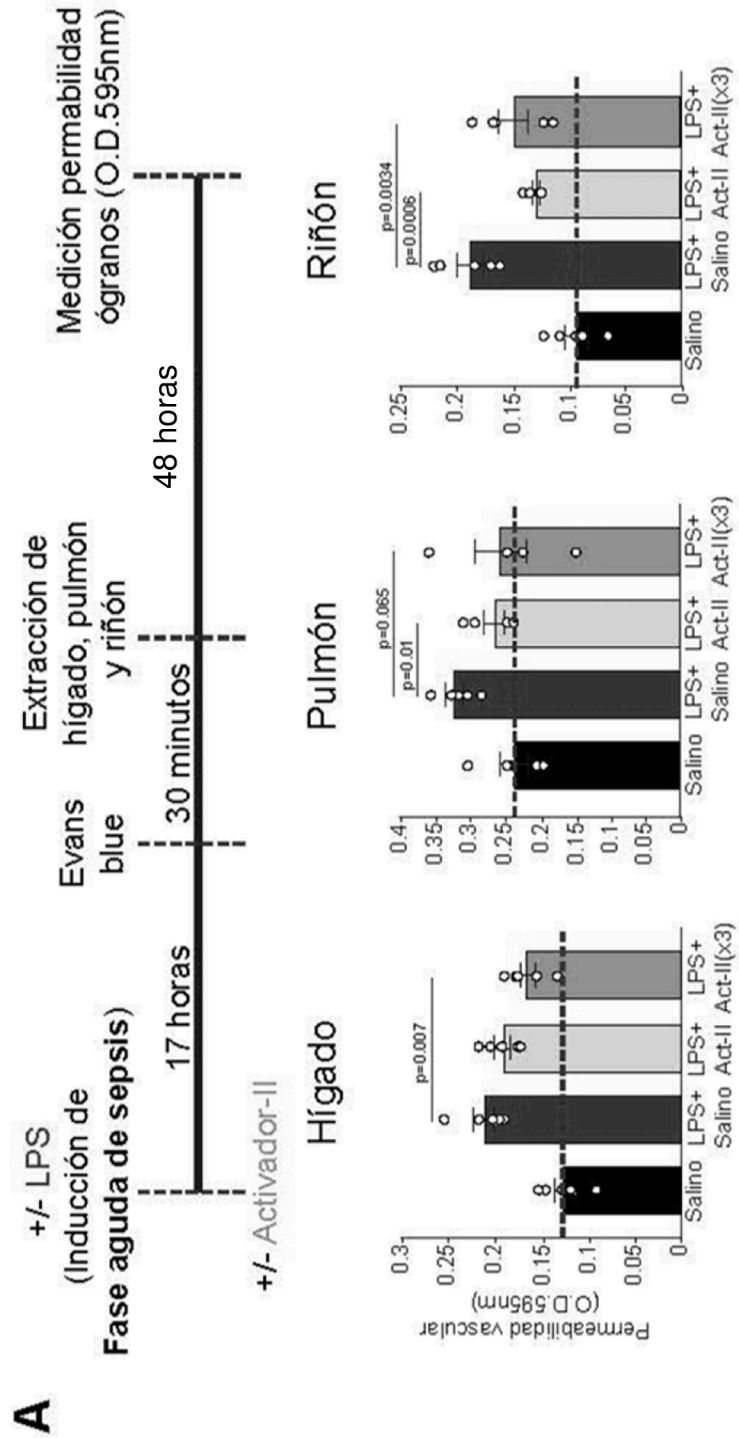


FIG. 4

B

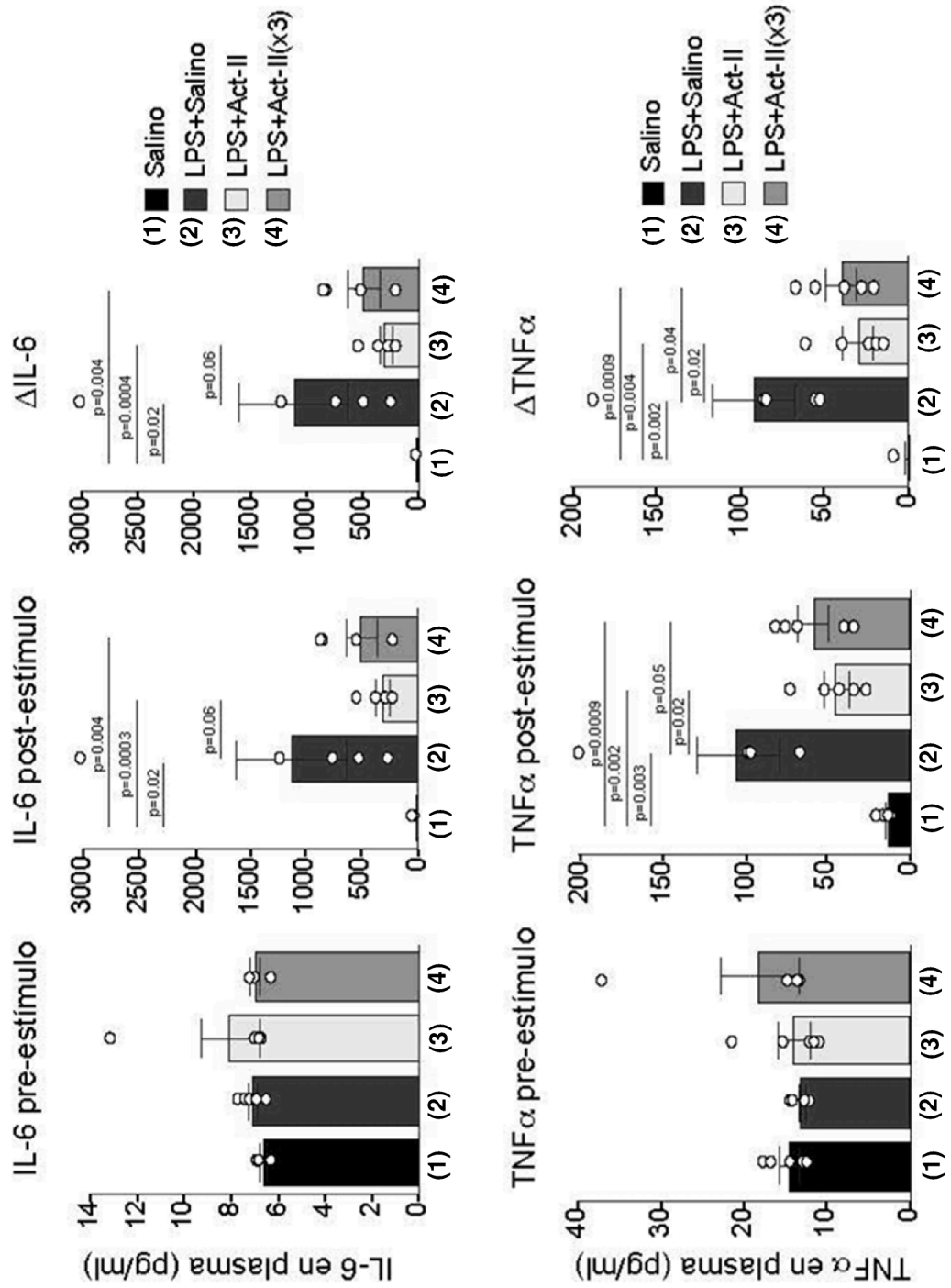


Figura 4 (continuación)

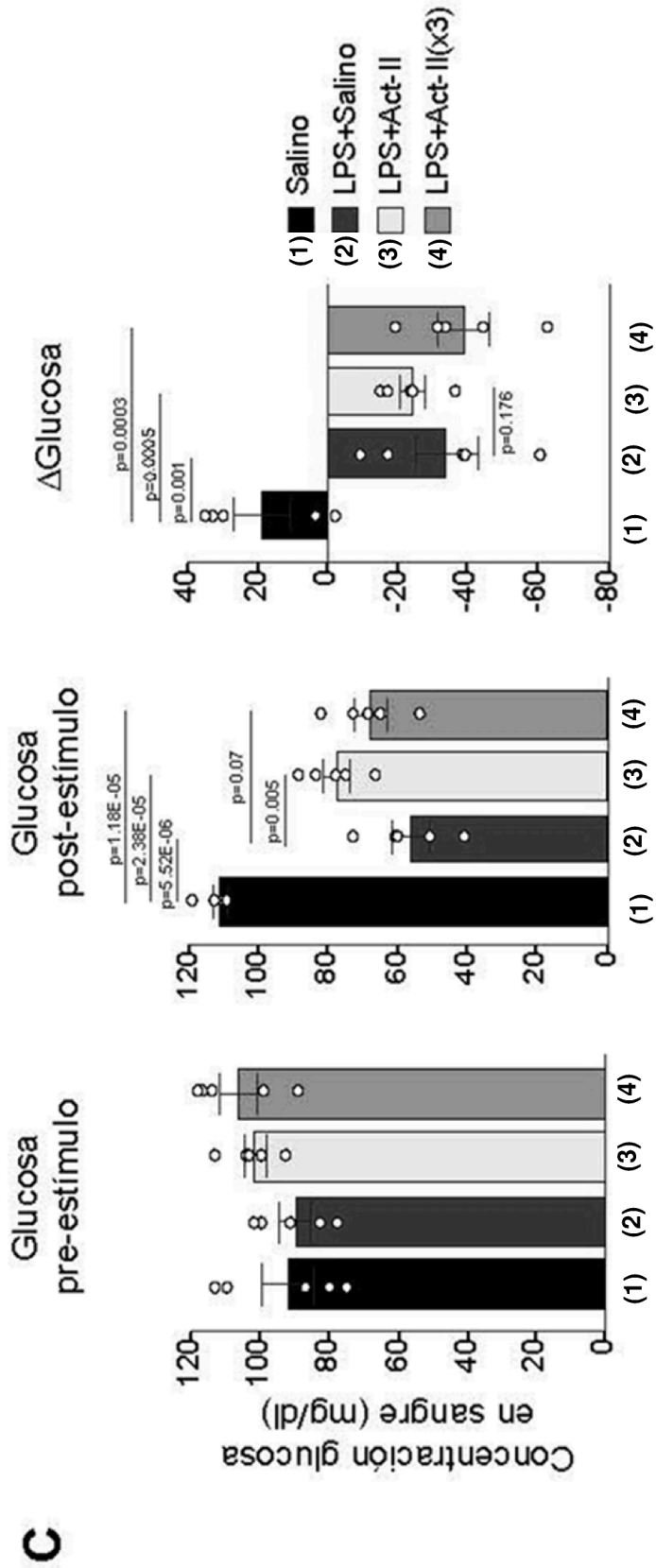


FIG. 4 (continuación)



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201930571

22 Fecha de presentación de la solicitud: 21.06.2019

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C07K14/24** (2006.01)
A61P31/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 2016296595 A1 (LEMICHEZ et al) 13/10/2016, todo el documento	1-30
Y	Rho Activator II-Datasheet, 01/10/2012 [en línea][recuperado el 05/05/2020]. Recuperado de Internet <URL: https://web.archive.org/web/20160910100448/http://www.cytoskeleton.com/pdf-storage/datasheets/cn03.pdf >, todo el documento	1-30
Y	SCHLEGEL N. et al. Impaired cAMP and Rac 1 Signaling Contribute to TNF- α -induced Endothelial Barrier Breakdown in Microvascular Endothelium. Microcirculation, 2009, Vol. 16, Páginas 521-533, <DOI: 10.1080/10739680902967427>, todo el documento	1-30
A	DE SOUZA P. et al. Impaired vascular function in sepsis-surviving rats mediated by oxidative stress and Rho-Kinase pathway. Redox Biology, 30/09/2016, Vol. 10, Páginas 140-147, todo el documento	1-30
A	WO 2007117680 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS) 18/10/2007, todo el documento	1-30
A	KNUST Z. et al. Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs) - a Growing Toxin Family. Toxins, 21/01/2010, Vol. 2, Páginas 116-127, <DOI: 10.3390/toxins2010116>, todo el documento	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
05.05.2020

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS, EBI