

VERSIÓN CORREGIDA

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2014/083232 A9**

(43) Fecha de publicación internacional  
5 de junio de 2014 (05.06.2014)

WIPO | PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2013/070831

(22) Fecha de presentación internacional:  
29 de noviembre de 2013 (29.11.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201231876  
30 de noviembre de 2012 (30.11.2012) ES

(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores: **TAVARES VÁZQUEZ, Eva**; Servicio Andaluz de Salud, Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **MIÑANO SÁNCHEZ, Javier**; Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Pº de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES).

(74) Mandatario: **ILLESCAS TABOADA, Manuel**; C/ Príncipe de Vergara, 197, Oficina 1º A, E-28002 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))
- con información relativa a la incorporación por referencia de partes y/o elementos ausentes (Regla 20.6)

(48) Fecha de publicación de esta versión corregida:  
10 de julio de 2014

(15) Información sobre la corrección:  
véase la notificación del 10 de julio de 2014

(54) Title: USE OF PEPTIDES OR ANTIBODIES AGAINST N-PROCALCITONIN FOR THE TREATMENT OF PULMONARY LESIONS

(54) Título : USO DE PÉPTIDOS O ANTICUERPOS ANTI N-PROCALCITONINA PARA EL TRATAMIENTO DE LESIONES PULMONARES

(57) Abstract: The invention relates to the use of an isolated peptide, an antibody or a fusion protein capable of binding to N-PCT, and of the compositions and pharmaceutical forms that include same, in the production of a drug for the treatment of pulmonary lesions.

(57) Resumen: El uso de un péptido aislado, de un anticuerpo o de una proteína de fusión con capacidad de unión a la N-PCT, y de las composiciones y formas farmacéuticas que los comprenden, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de lesiones pulmonares.



WO 2014/083232 A9

**Uso de péptidos o anticuerpos anti N-procalcitonina para el tratamiento de lesiones pulmonares.**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biotecnología y la medicina. Se refiere al uso de péptidos y/o anticuerpos capaces de unirse a la N-procalcitonina en la elaboración de un medicamento con actividad antiinflamatoria para el tratamiento de lesiones pulmonares, y más concretamente, lesiones pulmonares indirectas, causadas por ejemplo, por Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), sepsis, sepsis grave y shock séptico, traumatismos, pancreatitis, transfusiones múltiples de productos de origen sanguíneo, y también en particular, para el tratamiento de lesiones pulmonares agudas y del shock séptico.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La respuesta inflamatoria que provoca la disfunción y fallo de un órgano continua siendo el problema principal después de una lesión en muchas condiciones clínicas, como la sepsis. En estas condiciones, el síndrome de disfunción de órgano múltiple (MODS, *multiple organ dysfunction syndrome*) provoca el fallo del órgano. La lesión pulmonar aguda (ALI, *acute lung injury*) que se manifiesta clínicamente con un síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, *acute respiratory distress syndrome*) es un componente principal del MODS de varias etiologías.

La ALI y el ARDS son síndromes de fallo respiratorio agudo caracterizados por una intensa respuesta inflamatoria pulmonar, que incluye presencia neutrófila, edema intersticial, rotura de la integridad epitelial, y lesión pulmonar parenquimal (Ware & Matthay 2000. *N Engl J Med*; 342:1334–49).

Aunque se han probado muchas modalidades de terapia para la ALI, como con glucocorticoides (Thompson 2003. *Crit CareMed* 31:253–257), anticuerpos monoclonales antiendotoxina (Manocha *et al.*, 2002. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1795–1812), terapia con factor alfa de necrosis antitumoral (TNF- $\alpha$ ) [Leeper-Woodford *et al.*, 1991. *Am Rev Respir Dis* 143:1076–1082] y terapia con interleucina (IL)-1, los resultados han sido decepcionantes. Se ha sugerido que los resultados clínicos en pacientes con ALI/ARDS mejorarían con la modulación de la inflamación pulmonar (Brower 2001., *Chest* 120:1347–1367]. Los mediadores inflamatorios juegan

un papel clave en la patogénesis del ARDS, que es la causa principal de muerte en estas condiciones.

En modelos animales experimentales de sepsis y sepsis clínica, un elevado número de  
5 compuestos bacterianos inicia la producción excesiva y liberación de citocinas y quimiocinas. Las características de estas quimiocinas y citocinas, así como las altas concentraciones de miembros de la familia de los péptidos CT (calcitonina) obtenidos del gen CALC-I, incluyendo PCT (procalcitonina) y N-PCT (aminoprocacitonina) (Becker 2004. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 1512–1525) también se correlacionan con  
10 la severidad de la sepsis (Boveris et al., 2002. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1186–1193 ; Joshi et al., 2003. *FEBS Lett.* 555, 180–184.; Victor et al., 2004. *Int. Immunopharmacol.* 4, 327–347).

La procalcitonina (PCT o proCT) es un prohormona glicopeptídica de 116 aminoácidos  
15 y aproximadamente 13kDa de peso molecular. Esta molécula es el precursor de la calcitonina. Su síntesis comienza con la transcripción del gen CALC-I situado en el cromosoma 11p. Posteriormente este transcrito se procesa dando lugar a la preprocalcitonina, precursor de la PCT. Este precursor esta compuesto por 141 aminoácidos y por procesamiento posterior da lugar a la PCT. Su secuencia  
20 aminoacídica fue ya descrita en 1984 (Moullec et al. 1984. *FEBS lett.* 167: 93-97)

Esta PCT por su parte sufre sucesivas digestiones para dar lugar a 3 moléculas diferentes: aminoprocacitonina (N-procalcitonina, N-PCT o N-proCT) compuesto por  
57 aminoácidos de la zona N-terminal; calcitonina en forma inmadura y no activa,  
25 formada por 33 aminoácidos de la zona central de la PCT; y péptido correspondiente a la zona C-terminal, formado por 21 aminoácidos (residuos 96-116 de la PCT) y denominado CCP-I o katalcalcina (Jacobs et al. 1981. *J Biol Chem.* 256:1803-2807; Steenbergh et al. 1986. *FEBS lett.* 209: 97-103). En condiciones fisiológicas normales (no patológicas), estas moléculas se producen como resultado de un proceso  
30 intracelular proteolítico llevado a cabo por la enzima prohormona convertasa en las células C del tiroides y en las células neuroendocrinas del pulmón.

La N-PCT se describió por primera vez en ratas como un péptido neuroendocrino de  
57 aminoácidos derivada de la mitad N-terminal de la PCT (Burns et al., 1989. *Mol.*  
35 *Endocrinol.* 3, 140–147). La síntesis de N-PCT es compleja y comienza con la

traducción de una pre-prohormona de 141 aminoácidos [PPCT (pre-procalcitonina)] y la formación de su inmediato precursor PCT, un péptido de 116 aminoácidos (Le Moullec *et al.*, 1984. *FEBS Lett.* 167, 93–97; Steenbergh *et al.*, 1986. *FEBS Lett.* 209, 97–103).

5

Durante la inflamación sistémica aguda, en particular relacionada con una infección bacteriana, el control específico de tejidos Calc-1 se rompe y hay un aumento en la expresión del gen CALC-I que provoca una liberación de PCT y N-PCT desde todos los tejidos parenquimatosos y tipos diferenciados de células en todo el cuerpo, sin una correspondiente secreción de CT (Müller *et al.*, 2001. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86,396–404), y, lo que es más importante, sus niveles persisten durante períodos de tiempo relativamente largos y se correlacionan con la severidad y mortalidad de la sepsis [Assicot 1993. *Lancet* 341, 515–518.; Whang *et al.*, 1998. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3296–3301).

15

La inmunoneutralización específica de N-PCT puede inhibir la letalidad inducida por LPS en ratas. La capacidad de la anti-N-PCT para inhibir la producción, liberación o acción de citocinas proinflamatorias es parcialmente responsable del efecto protector de la anti-N-PCT. Nuestras investigaciones sugieren que la N-PCT, además de ser un marcador fiable de la severidad y mortalidad, juega un papel crucial en el choque séptico y afecta directamente el resultado al regular la producción de factores pro- y anti-inflamatorios cruciales para el desarrollo de este síndrome. La N-PCT puede actuar como un mediador importante para acciones neuroinmunes y podría servir como señal aferente circulatoria para la activación de respuestas inflamatorias a la sepsis. Sin embargo, no existe información relativa a los efectos de la N-PCT sobre la ALI.

El factor nuclear (NF)- $\kappa$ B es un factor de transcripción fundamental que es vital para la expresión de genes relacionados con la inflamación, como el iNOS y las citocinas inflamatorias. El NF- $\kappa$ B es normalmente retenido en el citoplasma, donde es ligada por una proteína inhibidora conocida como I $\kappa$ B. La estimulación de las quinasas I $\kappa$ B conduce a la fosforilación, ubiquitización y degradación del I $\kappa$ B lo que permite que el NF- $\kappa$ B se traduzca al núcleo e induzca la transcripción. Estudios previos indican que la mayoría de los agentes que activan el NF- $\kappa$ B transmiten sus efectos mediante la supresión de la fosforilación del I $\kappa$ B I $\kappa$ B y la posterior degradación La activación del

35

factor nuclear (NF)-κB se ha conocido como una ruta principal para el desarrollo de ALI durante la sepsis (Fan *et al.*, 2001. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1037–L1050).

- 5 Sin embargo, sigue siendo desconocido si la anti-N-PCT tiene efectos protectores sobre la ALI severa inducida por sepsis y, en su caso, si la inhibición del NF-κB juega algún papel en los mismos.

## 10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han demostrado que péptidos capaces de unirse a la N-PCT/PCT, o anti-N-PCT/PCT son capaces de restaurar los niveles pulmonares de CALC-I mRNA y procalcitonina, reducir las lesiones pulmonares, disminuir las  
15 citocinas proinflamatorias, mientras que al mismo tiempo aumentan la expresión de citocinas antiinflamatorias, inhiben la activación del NF-κB, y mejoran la supervivencia en sepsis. Los péptido, anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la N-PCT libre como a la N-PCT que forma parte de la molecula de procalcitonina (PCT, compuesta por N-procalcitonina, calcitonina y katacalcina o C-terminal) tendrán  
20 el efecto técnico reivindicado en la presente invención.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere uso de un péptido aislado, de ahora en adelante péptido de la invención, o de un anticuerpo, o un fragmento del mismo, de ahora en adelante anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención,  
25 con capacidad de unión a la N-PCT/PCT, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de lesiones pulmonares en mamíferos.

El término "aislado", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a nucleótidos o péptidos que: 1) se encuentran sustancialmente libres de componentes  
30 que normalmente acompañan o interaccionan con él en la naturaleza, o 2) si se encuentran en su medio natural, han sido sintéticamente (no naturalmente) alterados por la intervención humana y/o introducidos en una célula que no los posee de forma nativa. Por ejemplo, un nucleótido natural se convierte en "aislado" si se ha alterado, o si proviene de un ADN que ha sido alterado por medio de la intervención humana (por  
35 medio de, por ejemplo pero sin limitarnos, mutagénesis dirigida, inserciones,

deleciones, etc). De la misma manera, un nucleótido natural se convierte en "aislado" si se introduce por medios no naturales en un genoma no nativo a dicho nucleótido (transfección). Por tanto, el término "aislado" en este último caso, es equivalente al término "heterólogo".

5

El término "péptido", tal como aquí se utiliza, se refiere a un polímero formado por la unión, en un orden definido, de alfa-aminoácidos mediante un enlace peptídico, e incluye modificaciones o derivados del mismo, por ejemplo, glicosilación, fosforilación, acetilación, amidación, etc.

10

Los aminoácidos del péptido de la invención, en función de la orientación del grupo amino que lleva el átomo de carbono alfa, pueden pertenecer a la serie L o a la serie D, preferentemente, a la serie L. Adicionalmente, los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales o aminoácidos modificados o poco comunes. Entre los aminoácidos naturales están los aminoácidos alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina), los aminoácidos hidroxilados (serina y treonina), los aminoácidos azufrados (cisteína y metionina), los aminoácidos dicarboxílicos y sus amidas (ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico y glutamina), los aminoácidos que poseen dos grupos básicos (Usina, arginina e histidina), los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y los aminoácidos cíclicos (prolina). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de aminoácidos modificados o poco comunes incluyen ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2- aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2- aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alo- hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, 6-N-metil-lisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina, orinitina, etc.

30

En esta memoria se entiende por N-procalcitonina o N-PCT un péptido neuroendocrino de 57 aminoácidos derivado de la mitad N-terminal de la PCT. La síntesis de N-PCT es compleja y comienza con la traducción de una pre-prohormona de 141 aminoácidos [PPCT (pre-procalcitonina)] y la formación de su inmediato precursor PCT, un péptido de 116 aminoácidos. Se trata, por tanto, de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1.

35

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la N-PCT es un péptido de secuencia SEQ ID NO. 1

(APFRSALESSPADPATLSEDEARLLLLAALVQDYVQNKASELEQEEREGSSLDSPRS ) o, alternativamente, la SEQ ID NO: 2

5 (PFRSALESSPADPATLSEDEARLLLLAALVQDYVQMKASELEQEEREGSSLDSPRS).

En esta memoria también se considera como N-PCT una variante o un fragmento biológicamente activo de las secuencias SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

10 El péptido aislado o el anticuerpo o el fragmento del mismo de la invención se caracterizan por su capacidad de unión a N-PCT/PCT, y, ventajosamente, por su capacidad de inhibir la actividad biológica de la N-PCT/PCT. La capacidad de unión de un péptido o el anticuerpo o el fragmento del mismo a la N-PCT/PCT se puede determinar mediante cualquier método apropiado que permita determinar la unión  
15 entre dos moléculas (e.g., mediante un ensayo de afinidad), comprendiendo dicho método poner en contacto la N-PCT/PCT con el péptido a ensayar bajo condiciones que permiten la unión de dicho péptido a la N-PCT/PCT y evaluar la unión entre el péptido y la N-PCT/PCT. En una realización particular, dicho ensayo de afinidad puede realizarse, por ejemplo pero sin limitarse, utilizando la técnica de Resonancia de  
20 Plasmones de Superficie (SPR), o técnicas similares que utilicen N-PCT/PCT marcada radiactivamente, o, alternativamente, marcando radiactivamente el péptido a ensayar. En general, este tipo de ensayos de afinidad comprende poner en contacto la N-PCT, v.g., inmovilizada en los pocillos de una placa, con el péptido cuya capacidad de unión a N-PCT se desea conocer, y, tras incubación durante un periodo de tiempo apropiado,  
25 analizar la unión del péptido a la N-PCT/PCT. Los péptidos con baja afinidad por la N-PCT/PCT se eliminan mediante lavados mientras que los péptidos con mayor afinidad permanecen unidos a la N-PCT/PCT y pueden ser liberados rompiendo las interacciones moleculares entre ambas moléculas, lo que puede realizarse, por ejemplo, bajando el pH.

30

Ventajosamente, el péptido y/o el anticuerpo de la invención se caracterizan no solo por su capacidad de unión a la N-PCT/PCT, sino, además, por su capacidad para inhibir la actividad biológica de la N-PCT/PCT, y, en consecuencia, indirectamente, regular o inhibir, de forma transitoria o temporal, la actividad de NF- $\kappa$ B. Aunque no se  
35 desea estar vinculado a ninguna teoría, se cree que la capacidad de un péptido o de

un anticuerpo de inhibir la actividad biológica de la N-PCT/PCT es debida a la unión directa de dicho péptido o anticuerpo a la N-PCT/PCT. La capacidad de un péptido o de un anticuerpo de inhibir la actividad biológica de la N-PCT se puede analizar, *in vitro*, por cualquier método convencional apropiado ilustrativo de tal efecto, e.g.:

5 a) mediante un ensayo basado en la medida de la proliferación celular en un cultivo de linfocitos T efectores, en presencia de un anticuerpo anti-CD3, linfocitos Treg y timidina tritiada, y en presencia o ausencia del péptido a ensayar; o bien

b) mediante un ensayo basado en el co-cultivo de esplenocitos de ratones transgénicos OT-I (ratones en los que los linfocitos T presentan un receptor de la célula T específico para el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 4) de la ovalbúmina) con linfocitos Treg en presencia de antígeno [péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 4)], en presencia o ausencia de linfocitos Treg, y en presencia o ausencia del péptido a ensayar; o bien, alternativamente c) mediante un ensayo basado en una respuesta mixta linfocitaria (MLR) en la que se mezclan células efectoras de un ratón (e.g., BALB/c) con células dendríticas obtenidas de otra cepa de ratón (e.g., C57BL/6) en presencia o en ausencia de linfocitos Treg obtenidos de un ratón de una de las estirpes (e.g. BALB/c) y en presencia o ausencia del péptido a ensayar. Análogamente se pueden realizar experimentos similares utilizando linfocitos Treg de origen humano.

20 El péptido o el anticuerpo de la invención, con capacidad de unirse a la N-PCT puede identificarse por distintas técnicas. Así, por ejemplo, pero sin limitarse, puede emplearse la tecnología asociada con las librerías de fagos denominada *Biopanning* desarrollado por Smith, G.P., (1985), *Science* 228:1315. Esta técnica permite identificar péptidos que presentan una unión de alta afinidad con una proteína determinada (en este caso, N-PCT/PCT), y cuantificar, posteriormente, mediante ensayos *in vitro*, la capacidad de los distintos péptidos para inhibir la actividad biológica de dicha proteína. La secuencia de los péptidos que se unen a la N-PCT/PCT se puede deducir a partir de la secuencia del ADN correspondiente al cabo de varios ciclos de "*biopanning*" (generalmente 3).

30

Se han descrito diversas variaciones de la técnica de *biopanning* presentada por Smith y se hace referencia a Christian *et al.*, (1992) *J. Mol. Biol.*, 227:711; Cwiria *et al.*, (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378; Cull *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1865; Huls *et al.*, (1996) *Nature Biotechnol.*, 7:276; y Bartoli *et al.*, 1998 *Nature Biotechnol.*, 16:1068, el documento WO98/54312, patente estadounidense nº

35



5.582.981, Balass *et al.*, (1996) *Anal. Biochem.*, 243:264, el método SELEX, patente estadounidense nº 5.475.096, el documento WO99/06542A

Por tanto, en una realización preferida, el péptido de la invención se obtiene mediante un procedimiento que comprende:

- a) incubar una librería de péptidos expuestos en fagos se incuban con un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, o una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo,
- b) dejar que los péptidos expuestos en fagos se unan con el péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo (este paso se denomina *panning*), Utiliza las interacciones de unión de modo que sólo los péptidos específicos presentados por el bacteriófago se unen a la diana. Por ejemplo, pero sin limitarse, la selección de un anticuerpo presentado por el bacteriófago con antígeno recubierto en placas de microtitulación.
- c) Etapa de lavado: los fagos no unidos se eliminan. Sólo los fagos unidos con fuerte afinidad se mantienen.
- d) Los fagos específicamente unidos se eluyen en medio ácido. El pool eluido de fagos se amplifica *in vivo* y el procedimiento se repite.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la variante de la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO: 2, y el fragmento de la SEQ ID NO: 1 es la SEQ ID NO. 3 (QREGSSLDS PRS).

El resultado final es que los péptidos producidos por el bacteriófago son específicos. Después de varios ciclos, los clones individuales se aíslan y secuencian.

En otra realización preferida, el anticuerpo de la invención se obtiene mediante un procedimiento, de ahora en adelante primer método de generación de anticuerpos de la invención, que comprende:

- a) inmunizar un animal mamífero con un péptido según (c),
- b) extraer el suero del animal, y opcionalmente
- c) purificar el anticuerpo que reconoce específicamente N-procalcitonina.

En una realización más preferida, el procedimiento además comprende adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de la invención antes del paso (a). Aún

más preferiblemente, comprende conjugar el péptido con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*).

5 Por tanto, en otra realización más preferida, el anticuerpo de la invención se obtiene mediante un procedimiento que comprende:

- a) adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 o a una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo,
- b) conjugar el péptido con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*),
- 10 c) inmunizar un animal mamífero con un péptido según (c),
- d) extraer el antisuero del animal, y opcionalmente
- e) purificar el anticuerpo que reconoce específicamente N-procalcitonina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la generación de anticuerpos (de ahora en adelante segundo método de generación de anticuerpos de la invención) que comprende los siguientes pasos:

- a) inmunizar un animal mamífero con un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, de secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos,
- 20 b) analizar la titulación frente al péptido del paso (a) por una técnica inmunológica, en el animal mamífero del paso (a),
- c) fusionar los esplenocitos de los animales hospedadores para la generación de líneas celulares inmortalizadas,
- d) expandir los clones,
- 25 e) seleccionar los mejores productores.

En una realización preferida, el segundo método de generación de anticuerpos de la invención además comprende adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, de secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos, antes de la inmunización del animal. Aún más preferiblemente, comprende conjugarlo con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*).

Por tanto, en una realización aún más preferida, el segundo método de generación de anticuerpos de la invención comprende:

- a) adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1 o a una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo,
- b) conjugarla con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*),
- 5 c) inmunizar un animal mamífero con un péptido según (g),
- d) analizar la titulación frente al péptido del paso (g) por ELISA, en el animal mamífero del paso (h),
- e) fusionar los esplenocitos de los animales hospedadores para la generación de líneas celulares inmortalizadas,
- 10 f) expandir los clones,
- g) seleccionar los mejores productores.

En otra realización preferida, el péptido del paso (a) del primer o el segundo método de la invención, es el péptido de secuencia SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 3 se corresponde con la secuencia aminoacídica de los 13 últimos residuos de la proteína N-PCT.

15

Adicionalmente, el primer o el segundo método de la invención puede incluir un paso previo, que consiste en la generación del péptido o los péptidos de la invención, del paso (a), de manera recombinante. Por tanto, en otra realización preferida, el anticuerpo de la invención se ha obtenido por el primer o el segundo método de la invención, donde el péptido del paso (a) es un péptido recombinante.

20

En esta memoria se entiende por "animal" cualquier organismo del superreino *Eukaryota* y reino *Metazoa*. El término "mamífero" se utiliza para referirse a cualquier organismo del superreino *Eukaryota*, reino *Metazoa*, phylum *Chordata*, subphylum *Craniata*, superclase *Gnathostomata* y clase *Mammalia*.

25

Otro aspecto de la invención se refiere a una proteína de fusión que comprende:

- a) un péptido y/o un anticuerpo de la invención; y
- 30 b) un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula.

Un "péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula", en ocasiones identificado en esta descripción como "péptido transportador", es un péptido capaz de atravesar la membrana celular y penetrar en una célula desde el exterior, característica que puede ser conferida al péptido (v.g., péptido de la

35

invención) al que está fusionado (proteína de fusión de la invención) proporcionando de este modo una alternativa al transporte de péptidos de interés (v.g., péptidos de la invención) al interior de las células diana. Este mecanismo de entrada de péptidos a la célula es conocido como "transducción (o transporte) de proteínas" ("*protein transduction or delivery*"). Se conocen diversos péptidos transportadores con capacidad para internalizar un péptido en una célula (Schwarze S.R. et al., *Science*, 1999 Sep 3; 285(5433): 1569-72; Niesner U. et al., *Bioconjug. Chem.* 2002 Jul- Aug; 13(4):729-36; Ford K.G. et al., *Gene Therapy*, 2001; 8:1-4; y Gusarova G.A. et al., *J. Clin. Invest.* 2007 Jan; 117(1):99-111). Prácticamente cualquier péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención; no obstante, en una realización particular, dicho péptido transportador es un péptido que comprende un segmento "PTD" (del inglés "*protein transduction domain*"). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de proteínas que comprenden dichos dominios de transducción de proteínas (PTD) incluyen la proteína TAT (del inglés "*transacting translational protein*") del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-I), el factor de transcripción homeótico (Antp) de *Drosophila antennapedia* y la proteína de unión al ADN VP22 de herpesvirus simples 1 (HSV-I), aunque también se ha sugerido que esta propiedad de internalizar péptidos en células la poseen otras proteínas tales como la hemaglutinina de virus influenza, la lactoferrina, el factor de crecimiento de fibroblastos 1, el factor de crecimiento de fibroblastos 2 y las proteínas Hoxa-5, Hoxb-4 y Hoxc-8 (Ford K. G. et al., *Gene Therapy*, 2001; 8:1-4).

En una realización particular, dicho péptido transportador es un péptido derivado de la proteína TAT del HIV-I, que comprende la secuencia responsable de la transducción de péptidos, cuyo dominio básico (PTD) comprende los restos 49-57 de dicha proteína TAT de HIV-I, concretamente, la secuencia aminoacídica RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 5), o los restos 47-57 de dicha proteína TAT de HIV-I, tal como el péptido cuya secuencia de aminoácidos es YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 6) o el péptido cuya secuencia de aminoácidos es CGISYGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 7). En otra realización particular, dicho péptido transportador es un péptido derivado de la proteína Antp de *D. antennapedia*, que comprende el homeodominio de antennapedia (AntpHD) que comprende el dominio responsable de la transducción de péptidos (PTD) [restos 43-58 de dicha proteína Antp), que comprende la secuencia aminoacídica RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 8), o un fragmento funcional del

mismo. En otra realización particular, dicho péptido transportador es un péptido derivado de la proteína VP22 de HSV-I que comprende un dominio responsable de la transducción de péptidos (PTD).

5 En otra realización particular, dicho péptido transportador es un péptido derivado de la proteína supresora de tumores ARF (del inglés "*alternative reading frame*") que comprende la secuencia aminoacídica responsable de la capacidad del péptido de penetrar en las células, tal como el fragmento que comprende los restos 26-44 de dicha proteína ARF, concretamente, la secuencia aminoacídica KFVRSRRPRT  
10 ASCALAFVN (SEQ ID NO: 9), o un fragmento del mismo que comprende los restos 37-44 de dicha proteína ARF, concretamente, la secuencia aminoacídica SCALAFVN (SEQ ID NO: 10). El péptido de la invención puede estar unido a cualquiera de los extremos (amino o carboxilo) terminal del péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido de la invención en una célula. Por tanto, en una realización  
15 particular, el extremo carboxilo terminal del péptido de la invención está unido al extremo amino terminal de dicho péptido transportador, mientras que, en otra realización particular, el extremo amino terminal del péptido de la invención está unido al extremo carboxilo terminal de dicho péptido transportador.

20 El péptido de la invención puede estar unido directamente, o no, a dicho péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula. Por tanto, en una realización particular, el péptido de la invención [péptido (i)] está unido directamente a dicho péptido transportador [péptido (ii)], mientras que, en otra realización particular, el péptido de la invención [péptido (i)] está unido a dicho péptido  
25 transportador [péptido (ii)] a través de un péptido espaciador ("*linker*" o "*spacer*") entre dichos péptidos (i) y (ii). En consecuencia, si se desea, la proteína de fusión de la invención puede contener, además, un péptido espaciador situado entre dicho péptido de la invención [péptido (i)] y dicho péptido transportador [péptido (ii)]. Ventajosamente, dicho péptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural, tal  
30 como un péptido que da lugar a un dominio no estructurado. Prácticamente cualquier péptido con flexibilidad estructural puede ser utilizado como péptido espaciador; no obstante, ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos péptidos espaciadores incluyen péptidos que contienen repeticiones de restos de aminoácidos, v.g., de Gly y/o Ser, o cualquier otra repetición adecuada de restos de aminoácidos.  
35 Opcionalmente, si se desea, la proteína de fusión de la invención puede incluir una

secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención. Dicha secuencia estará situada en una región de la proteína de fusión de la invención que no afecte adversamente a la funcionalidad del péptido de la invención. Prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser utilizada para aislar o purificar una proteína de fusión (denominadas genéricamente péptidos etiqueta o "tag") puede estar presente en dicha proteína de fusión de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicha secuencia aminoacídica útil para aislar o purificar una proteína de fusión puede ser, por ejemplo, una cola de argininas (Arg-tag), una cola de histidinas (His-tag), FLAG-tag, Strep-tag, un epítipo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. (Terpe K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2003), 60:523-525),  $\beta$ -galactosidasa, VSV-glicoproteína (YTDIEMNRLGK) (SEQ ID NO: 11), o una secuencia de aminoácidos tal como: Ala His Gly His Arg Pro (SEQ ID NO: 12) (2, 4, y 8 copias), Pro lie His Asp His Asp His Pro His Leu Val He His Ser (SEQ ID NO: 13), etc.

Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el péptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. Más preferiblemente, la proteína de fusión comprende, además, una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido y/o un anticuerpo de la invención, o de una proteína de fusión de la invención, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende otro principio activo. En una realización aún más preferida de la invención, el otro principio activo es un compuesto inhibidor o regulador de la actividad de NF- $\kappa$ B, preferiblemente con actividad antiinflamatoria.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida o cualquier otro tipo de administración.

Otro aspecto de la invención se refiere a una forma farmacéutica, de ahora en adelante forma farmacéutica de la invención, que comprende un péptido y/o un anticuerpo de la invención, una proteína de fusión de la invención, o una composición farmacéutica de la invención.

En esta memoria se entiende por "forma farmacéutica" la mezcla de uno o más principios activos con o sin aditivos que presentan características físicas para su adecuada dosificación, conservación, administración y biodisponibilidad.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención, de una proteína de fusión de la invención, de una composición farmacéutica de la invención, o de una forma farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de lesiones pulmonares, o alternativamente a un péptido y/o un anticuerpo de la invención, una proteína de fusión de la invención, una composición farmacéutica de la invención, o una forma farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento de lesiones pulmonares. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la lesión pulmonar es una lesión pulmonar indirecta. En otra realización preferida, la lesión pulmonar es una lesión pulmonar aguda.

En esta memoria se entiende por "lesión pulmonar indirecta", la que se debe a la liberación en el torrente sanguíneo de sustancias como las citoquinas o similares, que activan complejos mecanismos de agregación de neutrófilos, lesión endotelial capilar

y activación de la coagulación, que en forma sistémica lesionan diferentes órganos, de los cuales uno de los más vulnerables es el pulmón.

5 Este complejo mecanismo de activación de moléculas provoca un deterioro de la función pulmonar, con cortocircuito intrapulmonar e hipoxemia. La característica principal de esta forma de presentación es una lesión pulmonar difusa, en parches y bilateral.

10 Los ejemplos más típicos son la sepsis de origen extrapulmonar que ejerce un auténtico efecto multiplicador y está habitualmente presente en casi todos los casos, considerándose un factor fundamental en la gestación del síndrome y las situaciones en las que el tratamiento del shock requirió grandes transfusiones de hemoderivados y soluciones expansoras plasmáticas.

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido y/o de un anticuerpo de la invención, de una proteína de fusión de la invención, de una composición farmacéutica de la invención, o de una forma farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del síndrome de distrés respiratorio agudo, o  
20 alternativamente a un péptido y/o un anticuerpo de la invención, una proteína de fusión de la invención, una composición farmacéutica de la invención, o una forma farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento del síndrome de distrés respiratorio agudo.

25 El síndrome de distrés respiratorio agudo (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) o síndrome de distrés respiratorio del adulto (SDRA). fue descrito por Ashbaugh y Petty en 1967 (*Lancet* 2 (7511): pp. 319-23) y su definición actual fue establecida en 1994 por la Conferencia de Consenso Americano-Europea: infiltrados pulmonares bilaterales de aparición aguda, en ausencia de congestión pulmonar (PCP < 18 mmHg, medida mediante catéter de arteria pulmonar) y una relación PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> <  
30 200. Durante los años que han pasado desde entonces, esta definición ha recibido diferentes críticas, las mayoría de las cuales se deben a la utilización de la relación PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> sin referencia a los valores de presiones inspiratorias y espiratorias con los que se ha medido. Usando un proceso de consenso un panel de expertos, reunidos a iniciativa de la ESICM, la ATS y la SCCM, desarrollaron a lo largo de 2011 una



definición que intenta ser viable, fiable y válida y cuya aplicabilidad pudiera ser evaluada objetivamente.

Se propuso una definición provisional con tres categorías de gravedad excluyentes  
5 basadas en el grado de hipoxia usando un nivel mínimo de PEEP de 5 cm H<sub>2</sub>O:

1) Media: PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ≤ 300;

2) Moderada: PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ≤ 200 y

3) Grave: PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ≤ 100. (Se elimina la noción de lesión pulmonar  
aguda), y con cuatro variables auxiliares para la gravedad: grado de alteración  
10 radiográfica, distensibilidad del sistema respiratorio ≤ 40 mL/cm H<sub>2</sub>O, PEEP ≥ 10 cm  
H<sub>2</sub>O y volumen minuto espirado corregido ≥ 10 L/m. Se modificó además el lapso de  
tiempo desde el insulto o el empeoramiento pulmonar hasta la aparición de los  
síntomas haciéndose más largo (una semana); se pusieron pautas para la  
interpretación radiográfica y se definió el origen del edema pulmonar como no  
15 totalmente explicado por fallo cardiaco o sobrecarga hídrica, enfatizándose la  
necesidad de valorarlo objetivamente mediante ecocardiografía en caso de ausencia  
de factores de riesgo.

Esta definición fue evaluada en una amplia cohorte retrospectiva procedente de  
20 ensayos clínicos previos. Las variables auxiliares no demostraron tener valor predictivo  
en cuanto al pronóstico, por lo que fueron suprimidas de la definición. La definición así  
resultante demostró tener un mayor valor predictivo para la mortalidad que la de la  
definición previa. Ésta fue para los diferentes estadios de 27% (IC 95% 24%-30%);  
32% (IC 95% 29%-34%); y 45% (IC 95% 42%-48%), respectivamente; P < 0,001.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un péptido y/o de un anticuerpo de la  
invención, de una proteína de fusión de la invención, de una composición farmacéutica  
de la invención, o de una forma farmacéutica de la invención, en la elaboración de un  
medicamento para el tratamiento del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica  
30 (SIRS), sepsis, sepsis grave y del shock séptico. Alternativamente se refiere a un  
péptido y/o un anticuerpo de la invención, una proteína de fusión de la invención, una  
composición farmacéutica de la invención, o una forma farmacéutica de la invención,  
para su uso en el tratamiento de SIRS, sepsis, sepsis grave y del shock séptico.

El concepto de sepsis comprende desde el SRIS del huésped a la infección grave sospechada o documentada. La sepsis grave se caracteriza o bien por la alteración aguda de la función de uno o más órganos (función hemodinámica, renal, respiratoria, hepática, hematológica o neurológica), o bien mala perfusión tisular (hiperlactacidemia) o hipotensión arterial (transitoria o persistente).

El shock séptico es definido por la presencia de hipotensión arterial que no responde a expansión del volumen intravascular y requiere perfusión de aminas para su tratamiento

10

#### Definiciones de sepsis

Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS): se considera que está presente cuando hay dos o más de los siguientes cuatro hallazgos clínicos:

1. Temperatura corporal por encima de 38°C o por debajo de 36°C.
2. Frecuencia cardíaca mayor de 90 latidos por minuto.
3. Hiperventilación, evidenciada por una frecuencia respiratoria mayor de 20 por minuto o una PaCO<sub>2</sub> menor de 32 mm Hg.
4. Recuento de leucocitos mayor de 12.000 o menor de 4.000 células/μL o con 10% de formas inmaduras.

20

Sepsis: cualquier infección documentada o sospechada con uno o más de los siguientes criterios:

- Fiebre (temperatura central > 38,3°C) o hipotermia (temperatura central < 36°C).
- Taquicardia > 90 latidos/minuto.
- Taquipnea > 30 respiraciones/minuto.
- Alteración de la consciencia.
- Edema o balance positivo > 20 ml/kg en 24 h.
- Hiperglicemia (glucosa plasmática >110 mg/dl) en ausencia de diabetes.
- Leucocitosis (> 12.000/mm<sup>3</sup>) o leucopenia (< 4.000/mm<sup>3</sup>) o recuento normal con > 10% formas inmaduras.
- Niveles plasmáticos altos de proteína C reactiva o procalcitonina.
- SvcO<sub>2</sub> > 70% o Índice cardíaco > 3,5 l/min/m<sup>2</sup>.

35

Sepsis grave: episodio de sepsis asociado a disfunción orgánica, hipoperfusión o hipotensión atribuible a la sepsis.

- Hipoxemia con  $PaO_2/FIO_2 < 300$  mmHg.
- Oliguria (diuresis  $< 0,5$  ml/kg/h durante al menos 2 horas).
- 5 • Creatinina incremento  $> 0,5$  mg/dl o valor  $> 2$  mg/dl.
- Trastorno de la coagulación (INR  $> 1,5$  o TTPa  $> 60$  segs).
- Trombocitopenia  $< 100.000/mm^3$ .
- Hiperbilirrubinemia (bilirrubina  $> 2,0$  mg/dl).
- Hiperlactacidemia ( $> 3$  mmol/l o 24 mg/dl).
- 10 • Hipotensión arterial (TAS  $< 90$  mmHg, TAM  $< 70$  o descenso de la TAS  $> 40$  mmHg).

Shock séptico: hipotensión arterial persistente que no pueda ser explicada por otras causas diferentes a la sepsis, y que no se recupera a pesar de la resucitación con volumen adecuada.

- 15 INR: International Normalized Ratio; SvO<sub>2</sub>: saturación de oxígeno de la hemoglobina en sangre venosa central; TAS: tensión arterial sistólica; TAM: tensión arterial media; TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado.

20 El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a el/los péptidos de la invención, el/los anticuerpos de la invención, una

25 proteína de fusión de la invención, una composición farmacéutica de la invención, o una forma farmacéutica de la invención, o a una composición, o una formamfarmacéutica o preparación que los comprenda.

30 Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un

cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

5 En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los ejemplos que acompañan a esta descripción. Particularmente, el término "variante" se refiere a  
10 un péptido sustancialmente homólogo a cualquiera de los péptido cuya secuencia aminoacídica se recoge en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a los péptidos resultantes de modificaciones postraduccionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o  
15 metilación.

Tal como aquí se utiliza, un péptido es "sustancialmente homólogo" a cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID  
20 NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3, respectivamente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3, respectivamente de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos,  
25 un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a cualquiera de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 3, pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

30 El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287

(1984) Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI); BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1999).

5 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 invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** Las alteraciones en los niveles pulmonares de expresión del gen CALC-I y la procalcitonina en animales con operación simulada y los animales sépticos tratados con vehículo o Anti-N-PCT 20 horas después de la ligadura y punción cecal (CLP). Los datos se presentan como media  $\pm$  SE (n = 10): \*\* P  $\leq$  0,001 versus el grupo de simulacro † P  $\leq$  0,05 frente al grupo vehículo.

20 **Fig. 2.** Las alteraciones en el contenido de agua pulmonar en los animales de simulacro y los animales sépticos tratados con vehículo o Anti-N-PCT 20 horas después de la ligadura y punción cecal (CLP). Los datos se presentan como media  $\pm$  SE (n = 10): \*\* P  $\leq$  0,001 versus el grupo de simulacro †P  $\leq$  0,05 frente al grupo vehículo.

25 **Fig. 3.** Alteraciones morfológicas de los pulmones determinadas por fotomicrografía. **A)** Fotomicrografía de una sección pulmonar de una rata operada de forma simulada. **B)** Fotomicrografía de una sección de pulmón de una rata séptica 22 horas después de la ligadura y punción cecal (CLP) tratada con vehículo. **C)** Fotomicrografía de una sección de pulmón de una rata séptica 20 horas después de CLP tratada con anti-NPCT. **D)** Puntuación histopatológica de la lesión pulmonar en animales con operación simulada y de los animales sépticos tratados con vehículo o anti-NPCT 20 horas después de CLP. Los datos se presentan como medias  $\pm$  SE (n = 5): \* P  $\leq$  0,05 versus grupo simulado; + P  $\leq$  0,05 versus grupo de vehículos.

30

**Fig. 4.** Actividad pulmonar de la mieloperoxidasa (MPO). CLP dió lugar a una mayor actividad MPO pulmonar en comparación con el grupo de animales de operación simulada. La MPO inducida se redujo a las 20 h tras el tratamiento anti-NPCT. \*  $p \leq 0,001$  en comparación con el tratamiento simulado, +  $p \leq 0,01$  en comparación con LPC + anti-NPCT.

**Fig. 5.** Alteraciones en la carga bacteriana en el líquido peritoneal **A)**, la sangre **B)**, y los pulmones **C)** en el grupo de animales con operación simulada y animales sépticos tratados con vehículo o anti-NPCT 20 horas después de la ligadura cecal y punción (CLP). Los datos se presentaron como medias  $\pm$  SE (n = 10): \*  $p \leq 0,01$  versus vehículo.

**Fig. 6.** Las alteraciones en los niveles pulmonares del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  **(A)**, IL-6 **(B)** IL-1 $\beta$  **(C)** IL-10 **(D)** MIP-2 **(E)** Rantes **(F)** en animales con operación simulada y animales sépticos tratados con vehículo o anti-NPCT 20 horas después de la ligadura y punción cecal (CLP). Los datos se presentan como media  $\pm$  SE (n = 10): \*  $P \leq 0,0$  versus grupo simulado, +  $P \leq 0,0$  versus grupo vehículo.

**Fig. 7.** Alteraciones en los niveles nucleares del factor nuclear (NF)-kB p65 **A)**, los niveles citoplasmáticos de I $\kappa$ Ba **B)** en los pulmones de los animales con operación simulada y los animales sépticos tratados con vehículo o anti-NPCT 20 horas después de la ligadura y punción cecal (CLP) . Los datos son expresados como medias  $\pm$  SE (n = 10): \*  $P \leq 0,05$  versus animales con operación simulada; #  $P \leq 0,05$  frente a animales con LPC tratados con vehículo.

**Fig. 8.** Alteraciones en la tasa de supervivencia 96 horas después de la ligadura y punción cecal (CLP) con el vehículo y con tratamiento anti-CLP NPCT. Había 22 animales en cada grupo. La tasa de supervivencia fue estimada por Kaplan-Meier.

## 30 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como

limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

## MATERIALES Y MÉTODOS EMPLEADOS

5

### Modelo animal de sepsis

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (270-325 g) (Centro de Producción e Investigación Animal, Universidad de Sevilla, Sevilla, España) en un recinto con temperatura controlada con un ciclo de luz:oscuridad de 12 horas y se alimentaron con una dieta de roedor nutricionalmente equilibrada (2014S; Harlan Iberica). Antes de la inducción de sepsis, las ratas ayunaron durante la noche pero se les permitió beber agua *ad libitum*. Se indujo la sepsis por medio de ligadura y punción cecal (CLP). Después de la anestesia con una inyección peritoneal de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg), se llevó a cabo una incisión de 2 cm en la pared abdominal, y se extruyó cuidadosamente el ciego. Aproximadamente el 25% del ciego se ligó justo por debajo de la válvula ileocecal para evitar la obstrucción del intestino. El ciego se puncionó dos veces utilizando una aguja estéril del calibre 16 y se exprimió para expulsar el material fecal a la cavidad peritoneal. Se cerraron las capas de músculo y piel del abdomen. Todas las manipulaciones anteriores fueron llevadas a cabo por el mismo cirujano para asegurar la consistencia. Este tramo de ciego ligado se eligió después de la evaluación de múltiples distancias de ligadura de tramos cecales. Esta distancia se eligió porque daba como resultado consistente aproximadamente un 80% de mortalidad en animales control. Inmediatamente después del procedimiento, se dio a los animales 20 mL/kg de de solución salina para permitir su recuperación. En un grupo de animales con operación simulada (n=6) el abdomen fue abierto y el ciego manipulado, pero no se llevó a cabo ninguna ligadura cecal o punción cecal, y el abdomen fue cerrado.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices acerca de uso y cuidados animales establecidas por el Consejo de la Directiva de las Comunidades Europeas (86/609/EEC) y la legislación española (BOE/67:8509/1988), y fueron aprobados por los Comités Institucionales de Ética e Investigación del Hospital Universitario de Valme.

35

### Administración de anti-N-PCT

Se disolvió el precursor anti-humanCT policlonal de conejo (AdB Serotec (1720-9670) en PBS/BSA 1% hasta una concentración final de 100  $\mu$ M. Los niveles de endotoxina de las preparaciones de anti-N-PCT fueron medidas por el método Limulus amebocito  
5 lisato, como se ha descrito previamente (Yang *et al.*, 2001. *Biochim Biophys Acta* 1537:167–174). Los resultados mostraron que los niveles de endotoxina en las preparaciones eran indetectables. Se impulsó una solución de anti-N-PCT o un vehículo 3 horas antes de la implantación por medio de minibombas Alzet de  
10 doscientos microlitros (velocidad de infusión, 8  $\mu$ l/h). Las ratas que sufrieron CLP fueron tratadas bien con anti-N-PCT (200  $\mu$ g/Kg, intraperitonealmente) o con un vehículo dos horas después de la CLP, seguido de una infusión continua de anti-N-PCT (1200  $\mu$ g/Kg) o un vehículo por medio de una minibomba durante 20 horas. Veinte horas después de la CLP (es decir, 20 horas después de la implantación de la  
15 minibomba), las ratas fueron sacrificadas y se tomaron muestras de sangre y tejido. La dosis total de anti-N-PCT que recibió cada rata fue de 1200  $\mu$ g/Kg de peso corporal.

### Determinación del contenido de agua y examen histológico

20 Previo a la inducción de inflamación sistémica, cada animal se anestesió como en el ejemplo 1. Se estimó el edema pulmonar comparando las relaciones de peso húmedo contra seco. Los tejidos pulmonares fueron secados en un horno a 70 °C durante 48 horas. Se midió el contenido de agua en los pulmones según se describió anteriormente (Wu *et al.*, 2007. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 176. pp 805–813). Se  
25 examinaron las alteraciones morfológicas en los pulmones 20 horas después del comienzo de la sepsis por medio de un microscopio óptico.

Para la evaluación histopatológica, se fijó el pulmón recién recogido en un búfer 10% formalin fosfato, se encapsuló en sucrosa, se congeló en hielo seco utilizando un  
30 compuesto OCT, y se crio-seccionó. Las secciones fueron tintadas con hematoxilina/eosina utilizando técnicas estándar.

Los exámenes morfológicos se llevaron a cabo mediante un microscopio óptico y se documentaron con fotografías. Se utilizó un sistema de evaluación para estimar el  
35 grado de daños pulmonares basándose en las siguientes características histológicas:



edema, hiperemia y congestión, marginación neutrófila e infiltración de tejidos, cuerpos extraños y hemorragia intraalveolar, e hiperplasia celular. Cada característica se evaluó como ausente, leve, moderada o severa, con un tanteo de 0-3. Se calculó un tanteo total para cada animal (Bachofen & Weibel 1982. *Clin Chest Med* 3:35–56).

5

#### **Medida de la actividad de la mieloperoxidasa en el tejido pulmonar.**

Se monitorizó la infiltración neutrófila en el pulmón por medio de la medida de la actividad MPO utilizando un método descrito previamente (Bradley *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 78:206–209). En breve, se homogeneizaron muestras de tejido a 50 mg/ml en un búfer de fosfato (50 mM, pH 6.0) con un 0,5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Las muestras fueron congeladas, descongeladas tres veces, y centrifugadas a 30,000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes fueron diluidos 1:30 con un búfer de ensayo consistente en un búfer de fosfato 50 mM con pH 6.0, 0,167 mg/ml de o-dianisidina (Sigma-Aldrich), y 0,0005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se determinó espectrométricamente la actividad de la enzima MPO en los homogeneizados mediante la medida de la absorbancia a 450 nm.

15

#### **Carga bacteriana.**

20

Para determinar la carga bacteriana en el peritoneo, la cavidad peritoneal fue lavada con 5 ml de solución salina estéril. Se realizaron una serie de diluciones log. Para determinar la carga bacteriana en la sangre, se recogieron 100 µl de sangre y se diluyeron en solución salina. Para determinar la carga bacteriana pulmonar, se extrajeron los pulmones y se homogeneizaron cantidades iguales de tejido húmero y se centrifugaron brevemente para eliminar partículas gruesas. Se aplicaron diluciones log de tejido homogeneizado. Quinientos microlitros de cada dilución se colocaron en placas de sangre agar y se incubaron durante 24 horas a 37°C en condiciones aeróbicas. Se contaron las unidades que formaron colonias. Los resultados se expresaron como unidades que forman colonia por mililitro o miligramo de tejido húmedo.

25  
30

### **Determinación de citocina y quimiocina pulmonar**

Para la determinación de la citocina en tejidos, se aislaron extractos de proteína mediante la homogeneización del pulmón (50 mg de tejido/ml) en 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, con 0,5 mM DDT, y un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostics). Las muestras se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos y se almacenaron a -80°C hasta la determinación de la citocina. Los niveles de citocina y quimiocina fueron determinados por un inmuno-ensayo múltiple de array microesferas en suspensión (Procarta Cytokine assay. Affymetrix) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y normalizado a la concentración de la proteína en la muestra.

### **Extracción y cuantificación de la proteína**

Se homogeneizaron tejidos congelados de pulmón a 4°C en un búfer lisis que contiene 50 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 2% de sulfato dodecil de sodio (SDS) y un cóctel inhibidor de la proteasa (Roche Diagnostics). Los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 5000 g a 4°C durante 15 minutos para eliminar partículas celulares. El contenido total de proteína en las muestras homogeneizadas se extrajo utilizando el Tripure® Isolation Reagent (Roche Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este procedimiento permite aislar fracciones de proteína a partir de una única muestra. Los fragmentos de proteína obtenidos utilizando el Tripure Isolation Reagent fueron re-suspendidos en SDS 4% y urea 8 M en 40 mM Tris HCl, pH 7,4, y se hicieron rotar durante una noche a temperatura ambiente para una disolución total. El contenido de proteína de la fracción soluble se determinó por espectrofotometría a 280 nm. El contenido de PCT fue analizado mediante la técnica de Western blotting según se describe a continuación, utilizando  $\beta$ -actina como control interno.

### **Expresión del gen Calc-1 en muestras pulmonares**

La expresión del gen CALC-1 se llevó a cabo según se ha descrito previamente (Tavares & Miñano, 2010 Clinical Science 119, (519–534) a 20 h después de la CLP (n=10) ratas por punto de tiempo).

### **Análisis de la proteína PCT**

Se utilizaron Western immunoblots utilizando un anticuerpo PCT anti-humano monoclonal de ratón (NB120-14817; Novus Biologicals) para analizar la PCT  
5 endógeno en los pulmones de las ratas. Se analizaron muestras de los pulmones (100 µg de proteína total) por SDS-PAGE 18% y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Whatman GmbH, Dassel, Alemania). Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente en un búfer PBS-Tween (0,01 M PBS y 0,1% Tween 20) que contenía un 5% de leche desnatada y se incubaron  
10 durante 4 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en el búfer PBS-Tween con un 0,5% de leche desnatada. Se utilizó el anticuerpo anti-PCT (1:2000; Santa Cruz Biotechnology). Después del lavado, se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con IgG de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Chemicon).

15

Después del enjuagado, se llevó a cabo la siguiente detección utilizando un kit de detección por quimioluminiscencia (Thermo Scientific, Rockford, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas y normalizadas utilizando el software PCBAS 2.08e (Raytest, Inc., Düsseldorf,  
20 Alemania).

### **Análisis Western blotting de la translocación nuclear NF-κB**

Se prepararon extractos nuclear y citoplásmico para el análisis mediante la técnica de  
25 Western blot de NF-κB p65 (nuclear) y el inhibidor de la expresión de NF-κB (IκBα, citoplásmico) (se utilizó proteína quinasa activada por mitógeno p44/p42 total [MAPK] y b-actina como controles para las proteínas nuclear y citoplásmica, respectivamente). Se analizaron cantidades iguales de pulmón homogeneizado (50 µg de proteína total) mediante 12% SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa  
30 (Protran®, Whatman®, Whatman GmbH, Alemania). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche desnatada en seco (BioRAD) TPBS (0,1% Tween-20 en Búfer Salino de Fosfato). Después del bloqueo, las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos policlonales de conejo NF-κB p65 y IκBκ (1,500; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA). Luego, se incubaron  
35 las membranas con el anticuerpo secundario adecuado, IgG (H+L) de cabra anti-

conejo inmunopuro conjugado con peroxidasa de rábano, a una dilución de 1/20000 y posteriormente se utilizó el método de detección por quimioluminiscencia plus mejorado con el kit de detección de Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific). Como controles internos se utilizaron anticuerpo MAPK p44/p42 anti-total (para la proteína nuclear, diluido 1:500; Santa Cruz Biotechnology) o anticuerpo anti- $\beta$ -actina (para la proteína citoplasmática, diluido 1:1000; Santa Cruz Biotechnology). Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas y normalizadas utilizando PCBAS, versión 2.08e (Raytest Inc., Düsseldorf, Alemania).

## 10 **Estudio de supervivencia**

En grupos adicionales de animales, se administró anti-N-PCT o un vehículo según se ha descrito anteriormente. Veinte horas después de la CLP, se extirpó el ciego necrótico y se limpió la cavidad abdominal dos veces con 40 ml de solución salina normal templada y esterilizada. Se cerró entonces la incisión abdominal en capas. El procedimiento de extirpación del ciego en animales que sufrieron CLP se llevó a cabo para simular la situación clínica en la que el foco séptico se extrae cuando es posible. Se permitió entonces a los animales comer y beber ad libitum y se monitorizaron durante 10 días para registrar cambios de peso corporal y supervivencia.

20

## **RESULTADOS**

### **Alteraciones en la expresión del gen Calc-I pulmonar y la procalcitonina**

25 Como se muestra en la Figura 1A, los niveles pulmonares de CALC-I mRNA en las ratas sujetas a sepsis presentaron un aumento significativo 20 horas después de la operación en comparación con los animales con operación simulada. Cuando los animales sépticos fueron tratados con anti-N-PCT, se redujo significativamente el contenido del gen CALC-I en los pulmones.

30

### **Efectos de la administración de anti-N-PCT sobre la lesión pulmonar aguda**

Como se muestra en la Figura 2, las ratas sujetas a sepsis presentaron un aumento significativo en el contenido de agua en los pulmones en comparación con los animales con operación simulada ( $P < 0,01$ ). Cuando los animales sépticos fueron

35

tratados con anti-N-PCT, se redujo el contenido de agua en los pulmones y no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el contenido de agua en los pulmones entre los animales con operación simulada y aquellos que sufrieron CLP y fueron tratados con anti-N-PCT. En términos de cambios histopatológicos, la lesión pulmonar (caracterizada por la disrupción de la arquitectura pulmonar, la extravasación de células rojas, y células inflamatorias en el espacio alveolar) estaba presente en los animales que sufrieron CLP tratados con un vehículo (Figura 3). Las ratas tratadas con anti-N-PCT presentaban una gran reducción de células inflamatorias infiltradas y una mejora significativa de la arquitectura del pulmón (Figura 3). Como indica la Figura 3, la puntuación de la lesión pulmonar aumentó significativamente 20 horas después del tratamiento con CLP y un vehículo en comparación con los animales con operación simulada ( $P < 0,01$ ). La administración de anti-N-PCT después de la CLP redujo significativamente la puntuación de la lesión pulmonar un 45,4%.

#### 15 **Actividad del tejido MPO**

La actividad del tejido pulmonar MPO se presenta en la Figura 4. En el grupo que sufrió CLP, la actividad MPO del tejido pulmonar resultó haber aumentado significativamente ( $0,97 \pm 0,14$  contra  $7,52 \pm 0,49$ ), mientras que la anti-N-PCT provocó un descenso en la actividad MPO ( $3,39 \pm 0,41$ ;  $P < 0,05$ ). El descenso en la actividad MPO fue en paralelo con el descenso en la acumulación de neutrófilo polimorfonuclear. Aunque los niveles de actividad MPO fueron aún mayores en el grupo tratado con anti-N-PCT en comparación con el grupo que sufrió operación simulada.

#### 25 **Efectos de la administración de anti-N-PCT en la carga bacteriana**

Como se indica en las Figuras 5, las unidades que formaron colonia fueron determinadas para fluido peritoneal (Figura 5A), sangre (Figura 5B), y pulmones (Figura 5C) en todas las ratas 20 horas después de la CLP. Sin embargo, el número de unidades que formaron colonia fue significativamente menor en las ratas sépticas que recibieron tratamiento con anti-N-PCT que en aquellas que recibieron un tratamiento con un vehículo.

### **Efectos de la administración de anti-N-PCT en los niveles pulmonares de citocinas proinflamatorias**

Como se indica en la Figura 6, los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  y MIP-2 en los pulmones aumentaron un 29%, 117,4%, 214,6%, 75,78% y 331,3% respectivamente 5 20 horas después de la CLP ( $P < 0,05$ ). El tratamiento con anti-N-PCT redujo los niveles de TNF- $\alpha$  pulmonar un 29,9% en animales que sufrieron CLP ( $P < 0,05$ ), y no hubo una diferencia significativa en los niveles de TNF- $\alpha$  pulmonar entre los animales con operación simulada y los animales que sufrieron CLP y fueron tratados con anti-N- 10 PCT (Figura 6A). Similarmente, los niveles pulmonares de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10 y MIP-2 aumentaron 2,17 veces, 3,14 veces, 1,75 veces y 4,3 veces respectivamente 20 horas después de la CLP. El tratamiento con anti-N-PCT los disminuyó un 26,5% el IL-6 (Figura 6B), un 33,58% el IL-1b (Figura 6), un 68,5% el MIP-2 (Figura 6E), y aumentó un 25,06% el IL-10 (Figura 6C).

15

### **El anti-N-PCT inhibe la translocación de NF- $\kappa$ B inducida por sepsis en los pulmones**

Para estudiar si la anti-N-PCT tiene algún efecto en la translocación del NF- $\kappa$ B en los pulmones, se determinó la expresión del NF- $\kappa$ B p65 en el núcleo y la expresión del I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma 20 horas después de la CLP mediante un análisis de Western blot. Como se muestra en las Figuras 7A y 7B, los niveles de NF- $\kappa$ B p65 en el núcleo aumentaron 2,2 veces 20 horas después de la CLP ( $P, 0,05$ ). El tratamiento con anti-N-PCT, sin embargo, dio como resultado una disminución del 43,5% en los niveles nucleares de NF- $\kappa$ B (Figura 7A) y un aumento del 30,4% de los niveles citoplásmicos de I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 7B). Este resultado indica que el tratamiento con anti-N-PCT inhibe la degradación del I $\kappa$ B $\alpha$  y evita la translocación de NF- $\kappa$ B en el núcleo.

25

### **Efectos de la inmunoneutralización de la N-PCT en la tasa de supervivencia**

La tasa de supervivencia después de la CLP y de la extirpación cecal con administración de un vehículo fue del 40% en el Día 2 y disminuyó al 0% en los Días 3 (Figura 8). El tratamiento con anti-N-PCT, sin embargo, mejoró la tasa de supervivencia al 80% el Día 2 y al 65% el Día 3, lo que es significativamente mayor 35 que para el grupo tratado con el vehículo (Figura 8).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de un péptido aislado, o de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de lesiones pulmonares.
- 10 2. El uso de un péptido aislado, o de un anticuerpo o un fragmento del mismo según la reivindicación 1, que tiene, además, la capacidad de inhibir la actividad biológica de la N-PCT/PCT *in vitro* y/o *in vivo*.
- 15 3. El uso de un péptido aislado, o de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la N-PCT/PCT es un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, el péptido de secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos.
- 20 4. El uso de un péptido aislado con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el péptido se ha obtenido por un procedimiento de *biopanning*.
- 25 5. El uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende:
  - a) inmunizar un animal mamífero con un péptido según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
  - b) extraer el antisuero del animal, y opcionalmente
  - c) purificar el anticuerpo que reconoce específicamente N-procalcitonina.
- 30 6. El uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende los pasos (a) – (c) según la reivindicación anterior y, además, adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de la invención antes del paso (a).
- 35

7. El uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende los pasos según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, y además comprende conjugar el péptido con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) antes de la inmunización del animal.
8. El uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende:
- inmunizar un animal mamífero con un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, de secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos.
  - analizar la titulación frente al péptido por una técnica inmunológica, en el animal mamífero del paso (a),
  - fusionar los esplenocitos de los animales hospedadores para la generación de líneas celulares inmortalizadas,
  - expandir los clones, y opcionalmente
  - seleccionar los mejores productores.
9. El uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende los pasos (a)-(d) según la reivindicación 8, y además comprende adicionar una cisteína en uno de los extremos de un péptido de secuencia SEQ ID NO: 1, de secuencia SEQ ID NO: 2, o una variante o un fragmento biológicamente activo de los mismos, antes del paso (a).
10. El uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende los pasos según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, y además comprende conjugar el péptido con KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) antes de la inmunización del animal.



- 5 11. El uso de un anticuerpo o un fragmento del mismo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo se ha obtenido por un procedimiento que comprende los pasos según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde la técnica inmunológica del paso (b) es un ELISA.
- 10 12. El uso de un anticuerpo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, obtenido por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5-11, donde el péptido del paso (a) es el péptido de secuencia SEQ ID NO: 3, o una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo.
- 15 13. El uso de un anticuerpo con capacidad de unión a la N-PCT/PCT según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, obtenido por un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5-11, donde el péptido del paso (a) es un péptido recombinante.
- 20 14. Una proteína de fusión que comprende:  
a) un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 [péptido (i)]; y  
b) un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula [péptido (ii)].
- 25 15. Una proteína de fusión según la reivindicación 14, en la que dicho péptido transportador comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.
- 30 16. La proteína de fusión según la reivindicación 15, que comprende, además, un péptido espaciador situado entre el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 [péptido (i)] y dicho péptido transportador [péptido (ii)].
- 35 17. La proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-16, que comprende, además, una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención.

- 5 18. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido y/o de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 19. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, que comprende, además de al menos un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, otro principio activo.
- 15 20. La composición farmacéutica según la reivindicación 19, donde el principio activo es un compuesto inhibidor o regulador de la actividad de NF- $\kappa$ B con actividad antiinflamatoria.
- 20 21. Una forma farmacéutica que comprende un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-20.
- 25 22. El uso de un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, o de una forma farmacéutica según la reivindicación 21, en la elaboración de un medicamento.
- 30 23. El uso de un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, o de una forma farmacéutica según la reivindicación 21, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de lesiones pulmonares.
- 35 24. El uso de un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, de una composición farmacéutica según cualquiera de

las reivindicaciones 18-20, o de una forma farmacéutica según la reivindicación 21, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de lesiones pulmonares indirectas.

- 5 25. El uso de un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, o de una forma farmacéutica según la reivindicación 21, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de lesiones pulmonares agudas.
- 10 26. El uso de un péptido y/o un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, o de una forma farmacéutica según la reivindicación 21, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del síndrome de distrés respiratorio agudo.
- 15 27. El uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, o de una forma farmacéutica según la reivindicación 21, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la lesión pulmonar derivada de sepsis.
- 20 28. El uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 14-17, de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, o de una forma farmacéutica según la reivindicación 21, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del shock séptico.
- 25

Figura 1

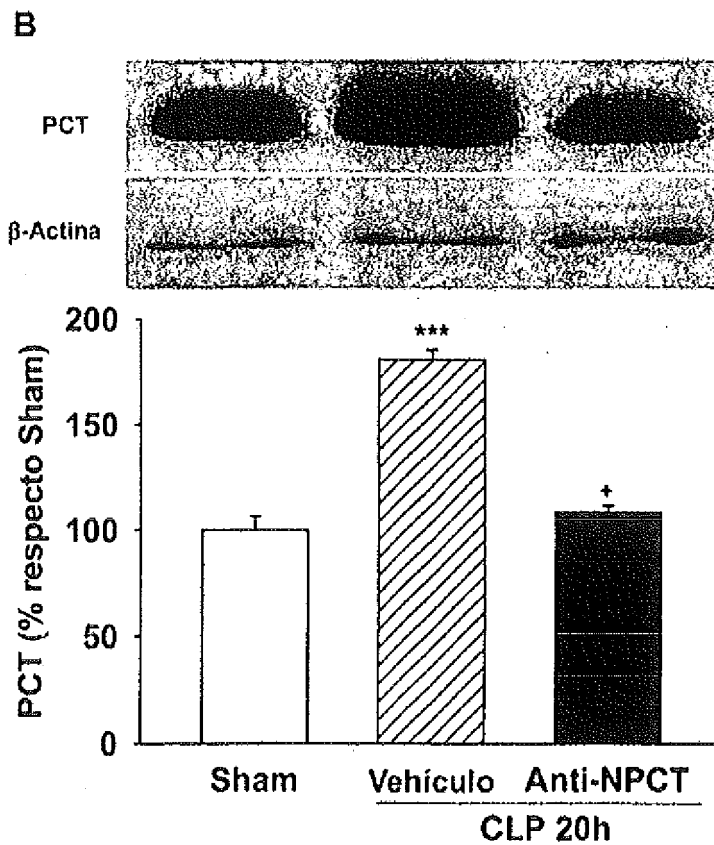
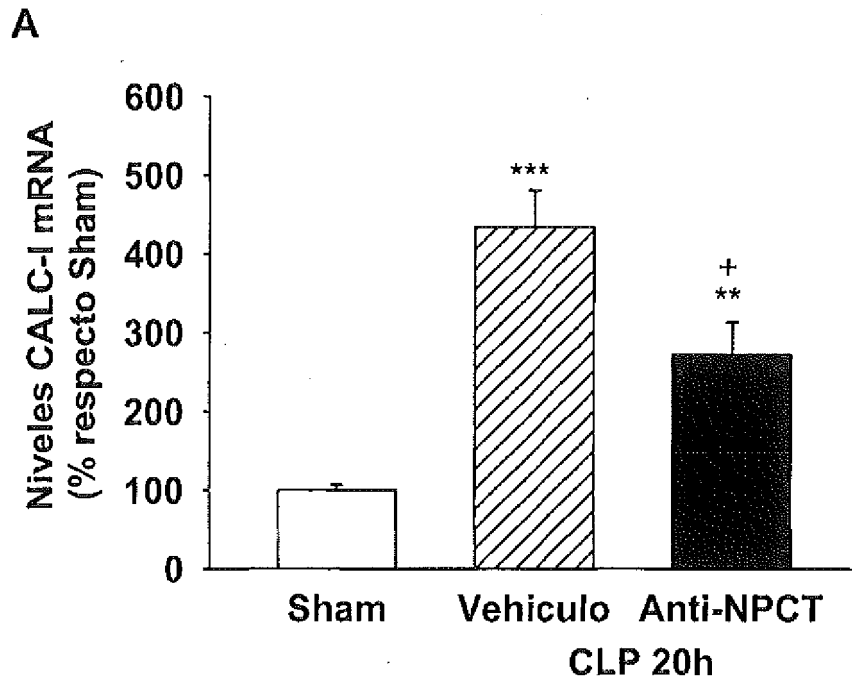


Figura 2

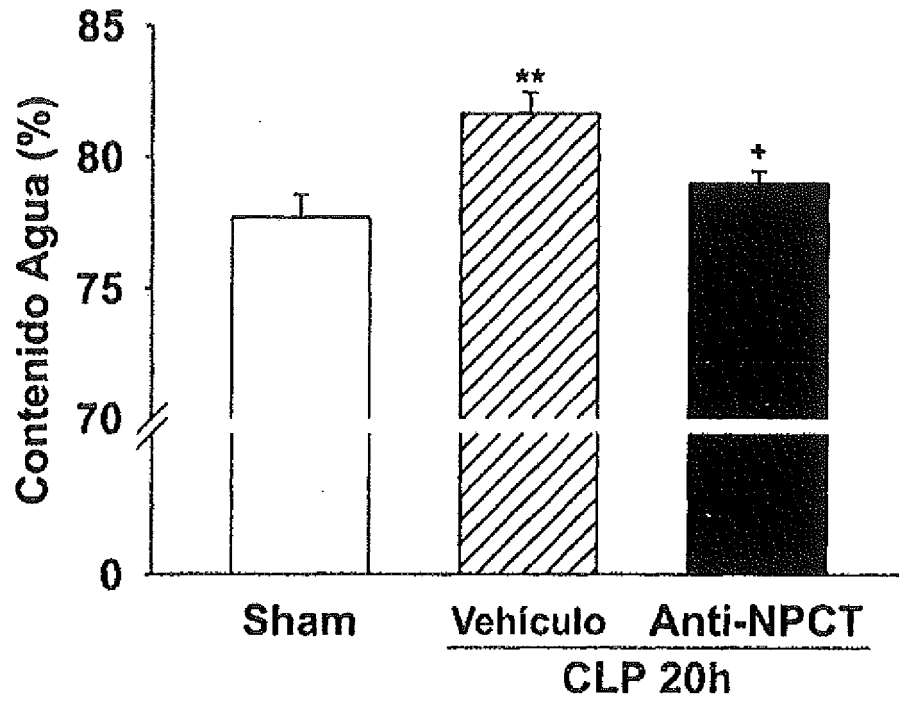


Figura 3

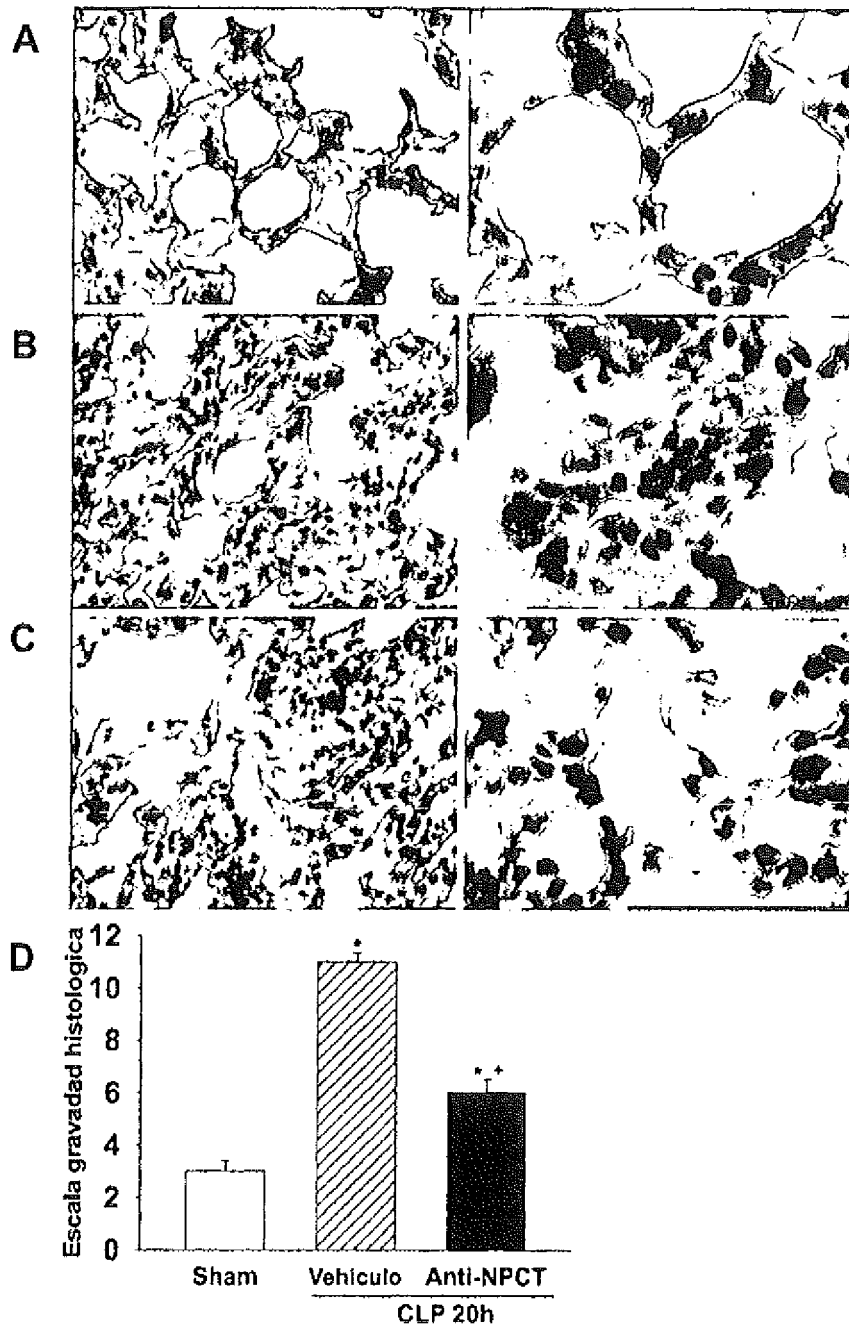


Figura 4

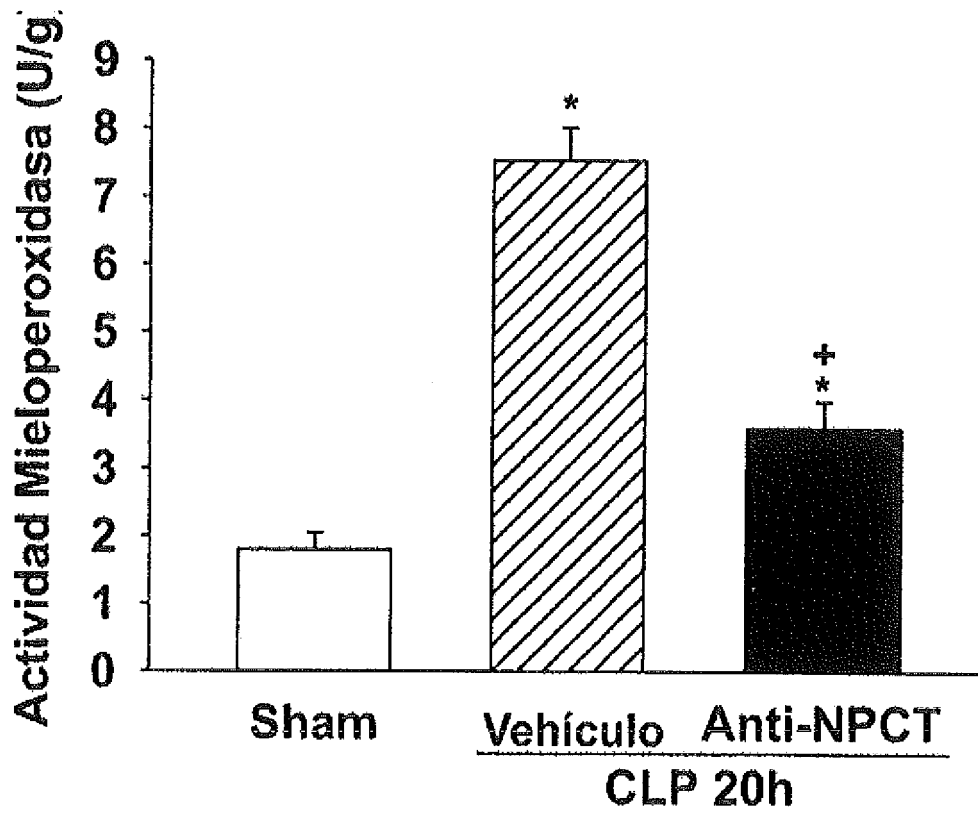


Figura 5

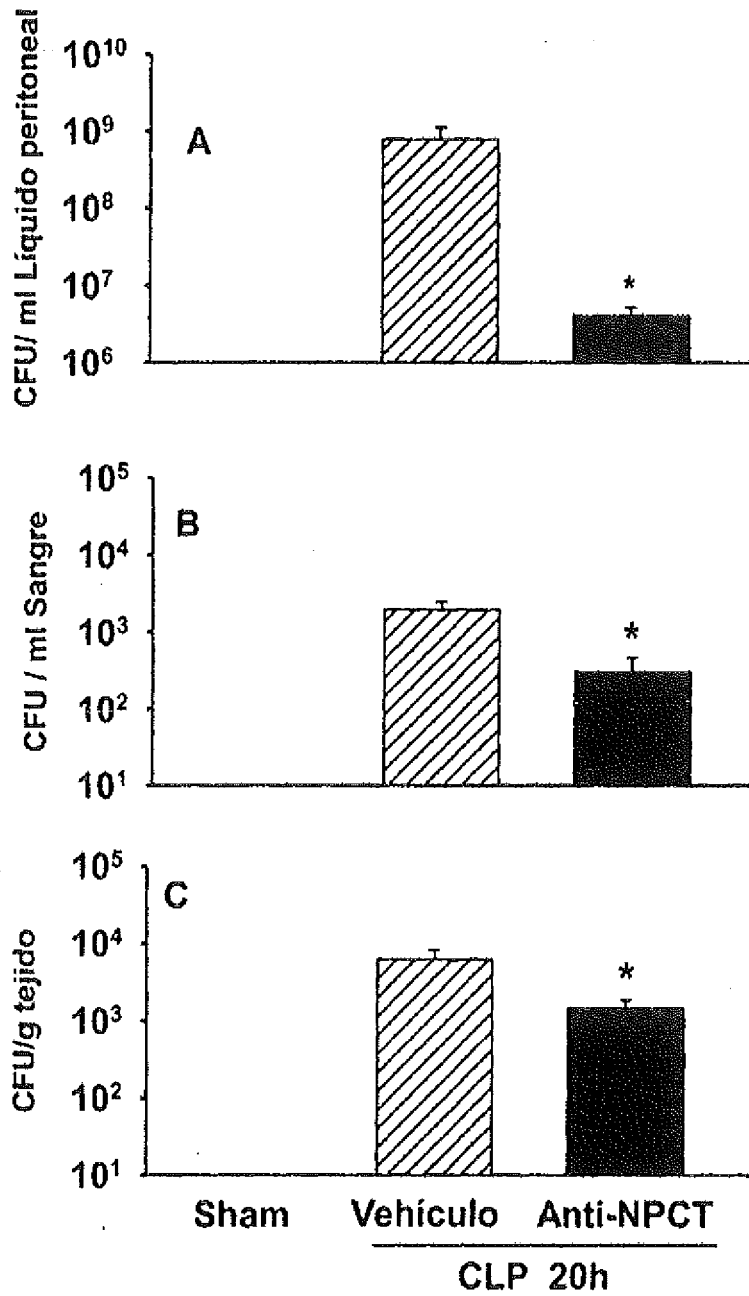




Figura 6

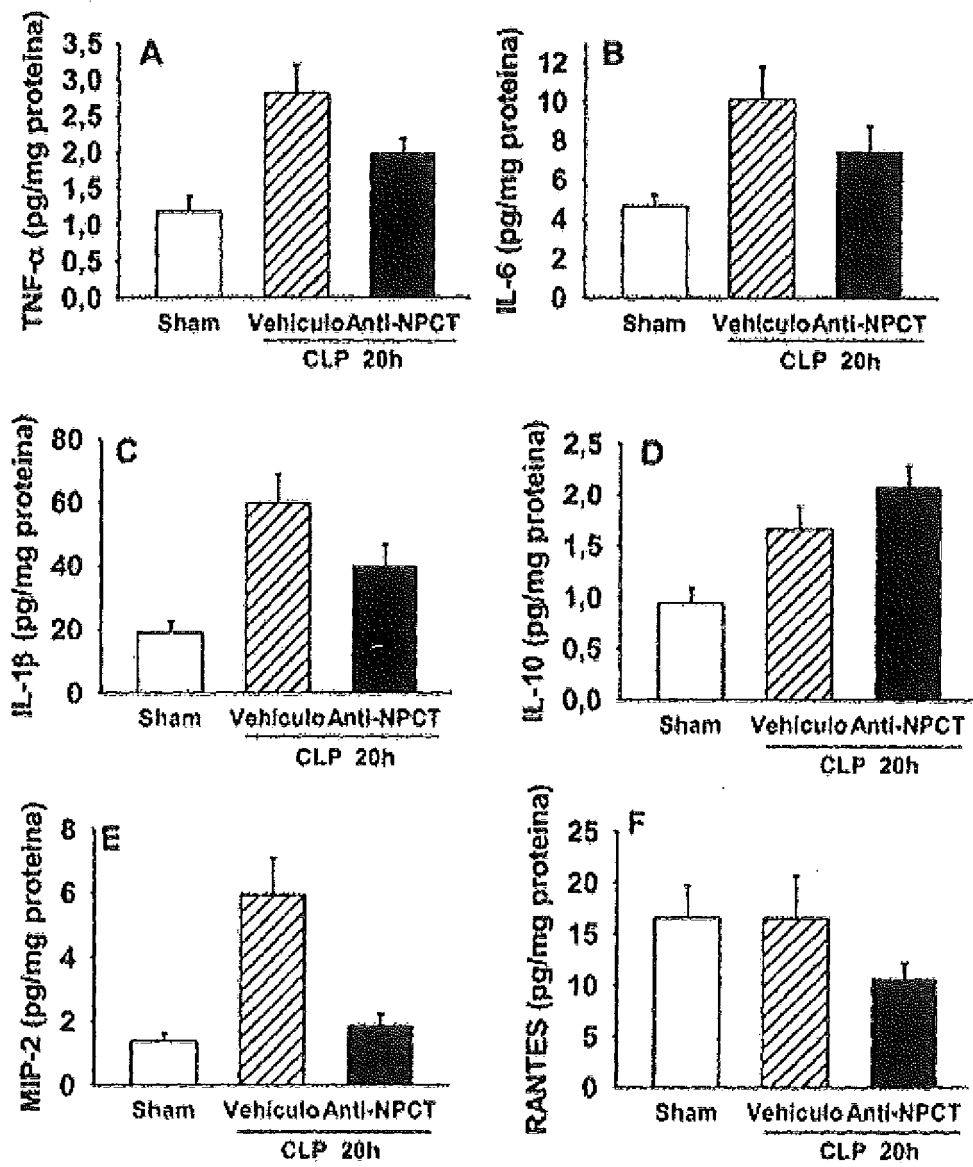


Figura 7

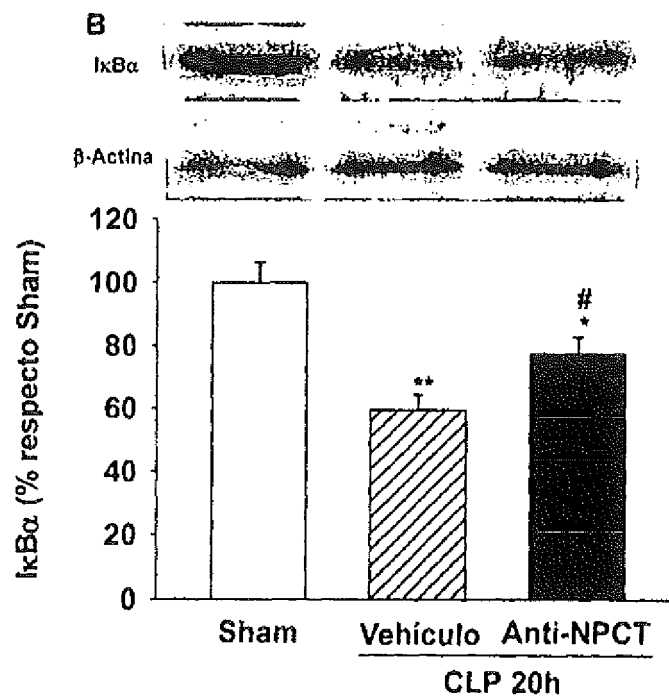
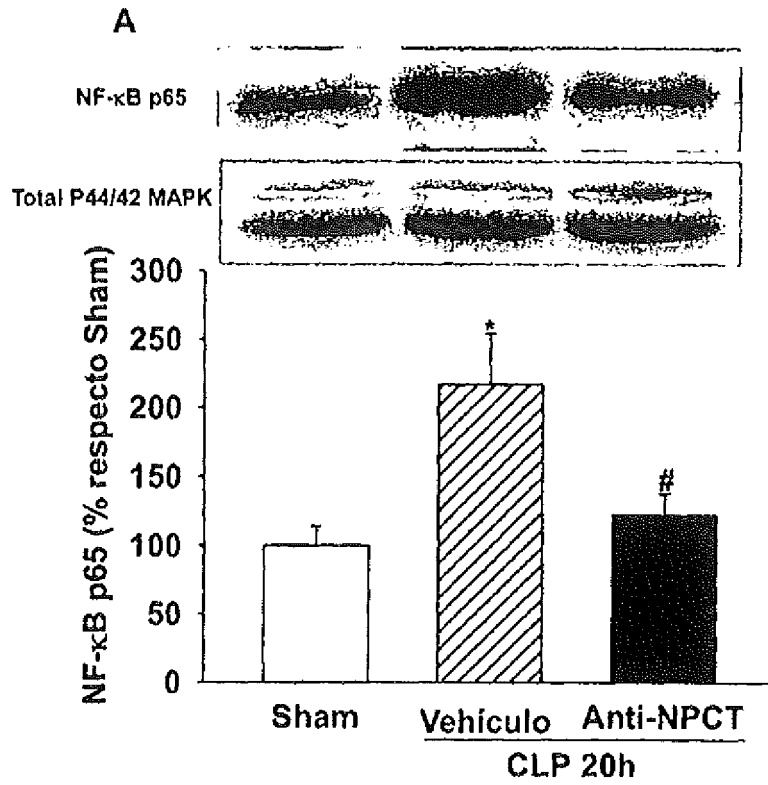
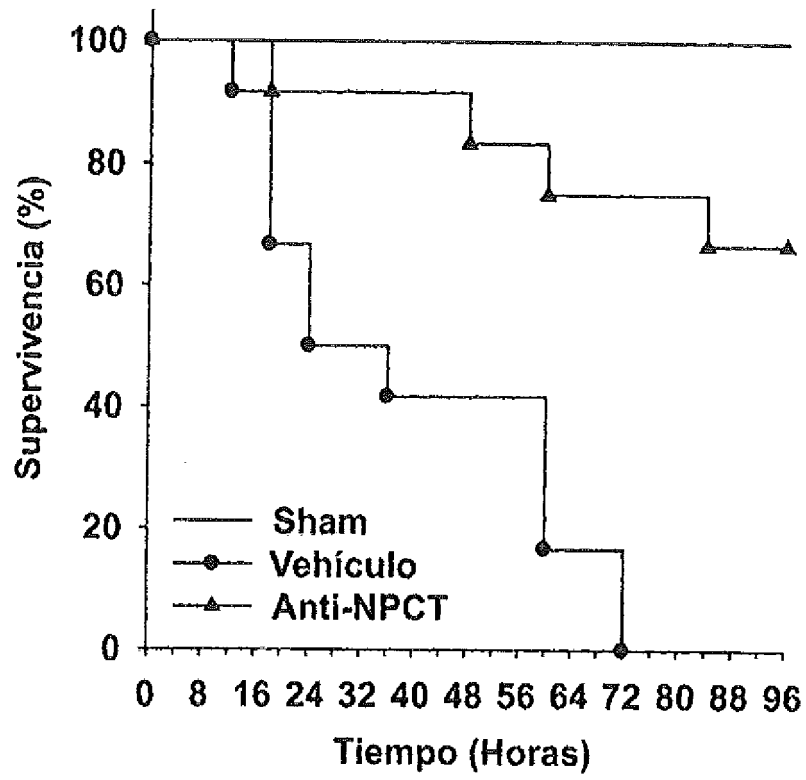


Figura 8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2013/070831

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A61K39/395** (2006.01)

**A61P11/00** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAVARES, E. et al. "Immunoneutralization of the aminoprocaltitonin peptide of procalcitonin protects rats from lethal endotoxaemia: neuroendocrine and systemic studies". CLINICAL SCIENCE. December 2010. Vol. 119, N° 12, pages 519-534, the whole the document.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28
X	Datasheets AbD Serotec. "RABBIT ANTIHUMAN CALCITONIN PROPEPTIDE", [on line], [retrieved the 28.01.2014]. Retrieved from Internet <URL: <a href="http://static.abdserotec.com/datasheets/1720-/human-calcitonin-propeptide-antibody-1720-9670.pdf">http://static.abdserotec.com/datasheets/1720-/human-calcitonin-propeptide-antibody-1720-9670.pdf</a> >, the whole document.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28
A	WO 2010125076 A1 (B.R.A.H.M.S. AKTIENGESELLSCHAFT) 04.11.2010, page 19, Table 2, peptide 23.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
20/02/2014

Date of mailing of the international search report  
(25/02/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. Novoa Sanjurjo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498466

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070831

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WHANG, K.T. et al. "Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation". JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM". September 1998. Vol. 83, N°. 9, pages 3296 - 3301; the whole document.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28
A	BECKER, K.L. et al. "Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin backs to its precursors". THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM. April 2004. Vol. 89, N°. 4, pages 1512 - 1525; the whole document.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28
P,X	US 20130046085 A1 (TAVARES VÁZQUEZ ET AL.) 21.02.2013, example 5.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

**see supplemental sheet**

3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see supplemental sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## CONTINUATION OF BOX II

## LACK OF CLARITY AND SUPPORT IN THE DESCRIPTION

The subject matter of the invention is not clearly defined or characterised. No search was carried out for products (peptides, antibodies and fusion proteins) which are the result of speculation, which have not been obtained or characterised, and for which consequently no tests have been carried out to demonstrate their supposed pharmacological characteristics. The claims that constitute inventions 1, 3 and 4 do not specify any technical features and are not supported by the description (PCT Article 6).

The search was restricted to invention 2, which includes the results of the tests presented in the examples. The subject matter of the invention is not clearly defined or characterised. No search was carried out for products (peptides, antibodies and fusion proteins) which are the result of speculation, which have not been obtained or characterised, and for which consequently no tests have been carried out to demonstrate their supposed pharmacological characteristics. The claims that constitute inventions 1, 3 and 4 do not specify any technical features and are not supported by the description (PCT Article 6).

The search was restricted to invention 2, which includes the results of the tests presented in the examples. (See Box III).

## CONTINUATION OF BOX III

## LACK OF UNITY OF INVENTION

Invention 1: The use of a peptide capable of binding to N-PCT/PCT to design a drug for treating pulmonary lesions. Claims 1-3 (in part), claim 4, and claims 18-28 (in part).

Invention 2: The use of the polyclonal antibody AbD Serotec 1720-9670 against N-PCT to design a drug for treating pulmonary lesions. Claims 1-3 (in part), claims 5-7, and claims 12, 13 and 18-28 (in part).

Invention 3: The use of a monoclonal antibody against N-PCT to design a drug for treating pulmonary lesions. Claims 1-3 (in part), claims 8-11, and claims 12, 13 and 18-28 (in part).

Invention 4: Fusion protein. Claims 14-17, and claims 18-28 (in part).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2013/070831

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2010125076 A1	04.11.2010	US2012122114 A1 JP2012525568 A EP2425259 A1 CN102395887 A	17.05.2012 22.10.2012 07.03.2012 28.03.2012
----- US2013046085 A1 -----	----- 21.02.2013 -----	----- NONE -----	-----  -----



# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070831

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K39/395** (2006.01)

**A61P11/00** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, WPI

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	TAVARES, E. et al. "Immunoneutralization of the aminoprocaltitonin peptide of procaltitonin protects rats from lethal endotoxaemia: neuroendocrine and systemic studies". CLINICAL SCIENCE. Diciembre 2010. Vol. 119, Nº 12, páginas 519-534, todo el documento.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28
X	Datasheets AbD Serotec. "RABBIT ANTIHUMAN CALCITONIN PROPEPTIDE", [en línea], [recuperado el 28.01.2014]. Recuperado de Internet <URL: <a href="http://static.abdserotec.com/datasheets/1720-/human-calcitonin-propeptide-antibody-1720-9670.pdf">http://static.abdserotec.com/datasheets/1720-/human-calcitonin-propeptide-antibody-1720-9670.pdf</a> >, todo el documento.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28
A	WO 2010125076 A1 (B.R.A.H.M.S. AKTIENGESELLSCHAFT) 04.11.2010, página 19, Tabla 2, péptido 23.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. <b>20/02/2014</b>	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional. <b>25 de febrero de 2014 (25/02/2014)</b>
--	---

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional <b>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS</b> Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado <b>M. Novoa Sanjurjo</b>  Nº de teléfono 91 3498466
--	---

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070831

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WHANG, K.T. et al. "Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation". JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM". Septiembre 1998. Vol. 83, N°. 9, páginas 3296 - 3301; todo el documento.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28
A	BECKER, K.L. et al. "Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin backs to its precursors". THE JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM. Abril 2004. Vol. 89, N°. 4, páginas 1512 - 1525; todo el documento.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28
P,X	US 20130046085 A1 (TAVARES VÁZQUEZ ET AL.) 21.02.2013, ejemplo 5.	1-3, 5-7, 12, 13, 18-28

**Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones nºs:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones nºs: **(1-3) parcialmente, 4, 8, 11, (12, 13) parcialmente, 14-17, (18-28) parcialmente**  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

**Ver Recuadro Suplementario**

3.  Las reivindicaciones nºs:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

**Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

**Ver Recuadro Suplementario**

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones nºs:
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones nºs:

**Indicación en cuanto a la protesta**

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

**CONTINUACIÓN DE RECUADRO II*****FALTA DE CLARIDAD Y SOPORTE EN LA DESCRIPCIÓN***

No está claramente definido ni caracterizado el objeto de la invención. No se han considerado para la búsqueda, productos (péptidos, anticuerpos y proteínas de fusión) que son el resultado de especulaciones, que no han sido obtenidos ni caracterizados y con los cuales por tanto no se han realizado ensayos que puedan demostrar las características farmacológicas que se les suponen. Las reivindicaciones que constituyen las invenciones nºs 1, 3 y 4, no tienen características técnicas y no se basan en la descripción. Art. 6 PCT.

La búsqueda se ha limitado a la invención nº 2, que incluye los resultados de los ensayos presentados en los ejemplos. No está claramente definido ni caracterizado el objeto de la invención. No se han considerado para la búsqueda, productos (péptidos, anticuerpos y proteínas de fusión) que son el resultado de especulaciones, que no han sido obtenidos ni caracterizados y con los cuales por tanto no se han realizado ensayos que puedan demostrar las características farmacológicas que se les suponen. Las reivindicaciones que constituyen las invenciones nºs 1, 3 y 4, no tienen características técnicas y no se basan en la descripción. Art. 6 PCT.

La búsqueda se ha limitado a la invención nº 2, que incluye los resultados de los ensayos presentados en los ejemplos. (Ver Recuadro 3).

**CONTINUACIÓN DE RECUADRO III*****FALTA DE UNIDAD DE INVENCION***

Invención 1.- Uso de un péptido con capacidad de unión a N-PCT/PCT en la elaboración de un medicamento para tratar lesiones pulmonares. Reivindicaciones (1-3) parcialmente, 4, (18-28) parcialmente.

Invención 2.- Uso del anticuerpo policlonal anti N-PCT AbD Serotec 1720-9670, en la elaboración de un medicamento para tratar lesiones pulmonares. Reivindicaciones (1-3) parcialmente, 5-7, (12, 13, 18-28) parcialmente.

Invención 3.- Uso de un anticuerpo monoclonal anti N-PCT, en la elaboración de un medicamento para tratar lesiones pulmonares. Reivindicaciones (1-3) parcialmente, 8-11, (12, 13, 18-28) parcialmente.

Invención 4.- Proteína de fusión. Reivindicaciones 14-17, (18-28) parcialmente.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2013/070831

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2010125076 A1	04.11.2010	US2012122114 A1 JP2012525568 A EP2425259 A1 CN102395887 A	17.05.2012 22.10.2012 07.03.2012 28.03.2012
----- US2013046085 A1 -----	----- 21.02.2013 -----	----- NINGUNO -----	-----  -----