

USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD6 EN LA PREVENCIÓN DEL DAÑO CELULAR Y ORGÁNICO DERIVADO DE UNA RESPUESTA HIPER-INFLAMATORIA

CAMPO DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se relaciona con las ramas de la biotecnología y la medicina; en especial con el uso de anticuerpos monoclonales (AcM) anti-CD6 la prevención del daño celular y orgánico derivado de una respuesta hiper-inflamatoria que se desencadena por, o afecta el resultado final de procedimientos médicos específicos.

10 ANTECEDENTES

- La utilización de soportes orgánicos extracorpóreos constituyó uno de los avances más importantes del siglo pasado en la medicina. Los de mayor frecuencia de utilización son la circulación extracorpórea (CEC) y las terapias de remplazo renal; en los dos métodos existe circulación de sangre por fuera del organismo a través de circuitos artificiales.

- La CEC o derivación cardiopulmonar o máquina/bomba corazón-pulmón, como también se le conoce, y la oxigenación con membrana extracorpórea (ECMO, por sus siglas en inglés) se aplica en diferentes circunstancias, como son la cirugía cardiovascular y el soporte en pacientes con disfunción severa cardiorrespiratoria. Las terapias de remplazo renal (diálisis, hemofiltración, hemodiafiltración y otras), son ampliamente utilizadas en fallos agudos y crónicos (Durmaz I y cols. (1999), Thorac Cardiovasc Surg. 118:306-315).

- Diferentes complicaciones se han descrito durante y después de estos procesos, incluida la cirugía cardíaca que por sí sola provoca una respuesta inflamatoria vigorosa, la cual tiene implicaciones clínicas importantes. Desde los inicios de la cirugía cardíaca con utilización de CEC se describieron complicaciones como fiebre, pericarditis y pleuritis (Ribot S y cols. (1971) J Thorac Cardiovasc Surg. 62:59-62).

- Además, la inflamación crónica promueve consecuencias adversas importantes. De hecho, la inflamación persistente de bajo grado se reconoce como un contribuyente importante al riesgo de mortalidad, eventos cardiovasculares (incluida la aterosclerosis precoz), progresión de la enfermedad renal, osteoporosis y otros resultados adversos; tanto en la enfermedad renal crónica como en la diálisis crónica. (Nowak K y Chonchol M (2018) Semin Dial. 31 (4):388-397; (Cobo G y cols. (2018) Nephrol Dial Transplant 33:iii35-iii40). En los procesos de remplazo renal las complicaciones pueden presentarse tanto a mediano como a largo plazo.

Después de décadas de investigaciones, en 1981 se describe el síndrome de respuesta inflamatoria post-cirugía cardíaca (SRIpCC). En pacientes de cirugía cardíaca con uso de CEC, el SRIpCC se presenta en mayor frecuencia y gravedad. Existen un grupo de factores como son las técnicas anestésicas, técnicas de perfusión, la exposición o contacto de la sangre con superficies extrañas (circuito de CEC), técnica quirúrgica y cuidados post-operatorios que activan, a través de mediadores, una respuesta inflamatoria. Esta respuesta, en un grupo de pacientes, puede ser contraproducente. Las disfunciones orgánicas provocadas por el síndrome de respuesta inflamatoria que incluye disfunción miocárdica, pulmonar, renal y hepática entre otras, pueden evolucionar a síndrome de disfunción multiorgánica en un 2 – 11% de pacientes intervenidos, con mortalidad entre 41–78% (Uyar IS y cols. (2013), *Cardiovasc J Afr.* 24: 322–326). Aunque en menor medida, también se describen lesiones neurológicas graves tras la cirugía cardíaca en un 6,1% (3,1% de lesiones focales y un 3% de lesiones difusas); incluso, disfunción del sistema nervioso central (Suárez Gonzalo L y cols. (2002 *Med Intensiva* 26(6):292-303).

El contacto de la sangre con superficies no endoteliales del circuito de CEC es responsable del inicio del síndrome de respuesta inflamatoria, en el que participan citocinas, factores de coagulación, fibrinólisis, complemento y sistema inmune celular. Diferentes autores han demostrado valores elevados de interleucinas como la IL-1, IL-6, IL-8 y de TNF- α en post-operatorio de cirugía cardíaca con uso de CEC, que se han asociado a disfunción miocárdica, inestabilidad hemodinámica, fiebre y lesión pulmonar (Uyar IS y cols. (2013), *Cardiovasc J Afr.* 24: 322–326; Durmaz I y cols. (1999), *Thorac Cardiovasc Surg.* 118:306-315). También, la utilización de hemodiálisis en pacientes con enfermedad renal crónica puede acompañarse de niveles elevados de biomarcadores inflamatorios como la IL-6 y la proteína C reactiva (PCR) compatible con proceso inflamatorio de bajo grado (Nowak K y Chonchol M (2018) *Semin Dial.* 31 (4):388-397). En resumen, la utilización de soportes orgánicos extracorpóreos puede acompañarse de respuesta inflamatoria o hiper-inflamatoria, aguda o persistente, de acuerdo a la frecuencia de uso del soporte, que puede inducir disfunciones orgánicas con resultados adversos.

Ante cualquier agresión, el organismo pone en marcha una respuesta con una fase inicial inflamatoria, mediada por factores humorales y celulares que se caracteriza por ser restringida y localizada que tiende a limitar el daño tisular; aísla, destruye y elimina los microorganismos infecciosos y activa los procesos de reparación necesarios para el retorno del órgano dañado a su función normal. Similar a como ocurre con el circuito de CEC, en la respuesta inmune de los pacientes lesionados, los monocitos y las células endoteliales liberan al inicio, en el área lesionada, una serie de citocinas pro-

- inflamatorias. El TNF α y la IL-1 son las primeras citocinas secretadas después de un trauma, estas estimulan a varias células inmunocompetentes e inducen la liberación de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 e interferón gamma). En los pacientes lesionados complejos con lesiones óseas y de partes blandas en que se diagnostican
- 5 un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) existe elevaciones de la IL-6 de hasta 200 ó 300 pg/mL. (Tanaka T y cols. (2016) *Immunotherapy* 8(8):959-970).
- Los avances en las técnicas anestésico-quirúrgicas y el uso de circuitos con mayor biocompatibilidad si bien han mostrado algún beneficio, no han logrado eliminar el SRIPCEC. La anestesia epidural torácica, combinada con anestesia general para
- 10 puentes aorto-coronarios disminuye la respuesta al estrés peri-operatorio, lo que puede disminuir el daño pulmonar miocárdico post-operatorio. Sin embargo, la anestesia epidural torácica no disminuye de forma significativa la respuesta de citocinas durante la CEC (Molina Méndez FJ. (2004) *Arch Cardiol Mex.*74 (S-2):505-508).
- 15 Existe un grupo de estrategias medicamentosas para impactar en distintos puntos de la reacción inflamatoria, como son el uso de esteroides, inhibidores de serinproteasa y fosfodiesterasa, antioxidantes (alopurinol, N-acetilcisteína, ácido alfa lipoico) y AcM anti-C5a. Estos fármacos se han utilizado antes, durante o posterior al uso de CEC. También se han realizado acciones tecnológicas como el uso de
- 20 hemofiltración/hemoperfusión y filtros anti-citocinas. Aunque con estos procedimientos y fármacos se ha logrado respuestas favorables; no han demostrado la efectividad esperada y aún se continúa informando una alta frecuencia de morbi-mortalidad asociada al uso de la CEC (Ribot S y cols. (1971) *J Thorac Cardiovasc Surg.* 62:59-62; Uyar IS y cols. (2013), *Cardiovasc J Afr.* 24: 322–326).
- 25 El uso de ácido alfa lipoico administrado en la solución principal de la CEC durante el proceder quirúrgico, disminuye las concentraciones de IL-6 y PCR; pero no ha demostrado el impacto clínico sobre la reducción de complicaciones o de la mortalidad (Uyar IS y cols. (2013), *Cardiovasc J Afr.* 24: 322–326). Tampoco el uso de esteroides de forma peri o intra-operatorios en cirugía cardíaca, reduce las complicaciones más
- 30 importantes ni la mortalidad a los 30 días. Además, incluye importantes eventos adversos como el riesgo de infecciones y daño miocárdico (Pasquali SK y cols. (2012) *Pediatrics.* 129(2):e385-e391; Whitlock RP y cols. (2015) *Lancet* 386(10000):1243-1253; Graham EM y cols. (2019) *J Am Coll Cardiol.* 74(5):659-668; Lomivorotov V y cols. (2020) *JAMA.* 323(24):2485-2492).
- 35 El inhibidor de tripsina urinaria administrado por vía intravenosa en el trans y post operatorio disminuye las concentraciones de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y transaminasas con una consiguiente disminución de la duración de la ventilación y del tiempo de

hospitalización en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), pero no se conoce si la disminución de estos parámetros disminuye la morbi-mortalidad de los pacientes tratados (Xu H y cols. (2017) Euro Rev Medical and Pharmacol Sc.; 21: 2220-2225; G. He, y cols. (2018) Herz <https://doi.org/10.1007/s00059-018-4732-0>). El pexelizumab (AcM anti-C5), tampoco demostró efecto clínico significativo en la reducción de la morbi-mortalidad y tampoco estuvo exento de reacciones adversas entre las que destacan infecciones incluyendo sepsis. (Shernan SK y cols. (2004) Ann Thorac Surg. 77:942-50).

El uso de AcM anti-factor D en monos sometidos a derivación cardiopulmonar demostró inhibición de la activación del complemento, de la expresión de CD11b en neutrófilos y monocitos así como disminución del incremento de la concentración de IL-6 en plasma, respecto al grupo control que no recibió el AcM; así como los marcadores de daño miocárdico y función renal y creatinina. Sin embargo, no se encontró en la literatura revisada un estudio en humanos donde el uso de AcM anti-factor D demostrara el efecto en la disminución de citocinas, como prevención y modulación de la respuesta hiper-inflamatoria que produce el paso de la sangre por circuito extracorpóreo ni de su consecuente daño celular.

La patente PCT/IB2021/052793 describe el uso de AcM anti-CD6 no depletantes que se unen específicamente por el dominio I del CD6 en el tratamiento de la tormenta de citocinas causada por agentes infecciosos tales como virus y bacterias. Los pacientes con neumonía tratados con estos AcM mostraron una reducción en los niveles de IL-6, IL-17, TNF α y PCR, lo que conllevó a una mejoría en los parámetros de funcionamiento pulmonar evitando que evolucionaran a estadios críticos o graves y a un mejor manejo de los mismos en la UCI.

Hasta el momento no existe información previa del uso de AcM contra el CD6, en la prevención del daño celular y orgánico derivado de la respuesta hiper-inflamatoria de origen no infeccioso desencadenada por procedimientos médicos producto del paso de la sangre por circuito extracorpóreo o por un trauma.

Inesperadamente, los inventores de la presente invención al emplear los AcM aquí descritos en pacientes con necesidad de CEC o que sufrieron un trauma, lograron una reducción del grado de la hiper-inflamación a través de una menor concentración de IL-6, PCR, y de marcadores de función y daño orgánico como LDH y TGP, con la consecuente prevención del daño celular y orgánico, impactando desde el punto de vista clínico al reducir la morbilidad en general, el fallo múltiple de órgano y la mortalidad post-operatoria.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

En una realización la presente invención se relaciona con el uso de AcMs que reconocen específicamente al CD6, en la prevención del daño celular y orgánico derivado de una respuesta hiper-inflamatoria que se desencadena por procedimientos médicos altamente invasivos, o afecta el resultado final de dichos procedimientos. Particularmente, estos AcMs son no depletantes y se une específicamente al dominio 1 del CD6. Estos AcM comprenden las secuencias SEQ ID NO 1 y 2 o tiene un 98% de identidad con estas y en este caso comprenden las secuencias SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 3. Alternativamente, estos AcMs pueden comprender las secuencias SEQ ID NO 4 y 5 o tener un 98% de identidad con estas y entonces comprenden las SEQ ID NO. 4 y SEQ ID NO. 6. Particularmente, estos AcMs anti-CD6 son humanizados de isotipo IgG1, preferentemente, el AcM itolizumab.

Particularmente, la presente invención se relaciona con el uso de los AcMs aquí descritos para prevenir el daño celular y orgánico derivado de los siguientes procedimientos o condiciones médicas: la cirugía cardíaca, cirugía de trasplante pulmonar, cirugía de aneurisma cerebral gigante, cirugía vascular, oxigenación extracorpórea de membrana, asistencia circulatoria mecánica, hemofiltración, diálisis renal y hemodiafiltración, cirugía de control de daño, trauma, politrauma, quemaduras, peritonitis necrotizante, síndrome de respuesta inflamatoria aguda, sin limitarse a estos.

En un aspecto adicional, la presente invención prevé la combinación de los AcMs anti-CD6 con agentes que se seleccionan del grupo que comprenden: anestésicos, sedantes, relajantes, antivirales, antibióticos, eritropoyetina, agentes que bloquean la interacción entre la IL-6 y el receptor de IL-6 y agentes que bloquean la interacción entre la IL1 y el receptor de IL1. Dicha administración se puede realizar de forma serial o concomitante.

En una realización adicional, la presente invención se relaciona con un método de tratamiento de un sujeto sometido a CEC que comprende la administración por vía intravenosa o subcutánea de los AcMs que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las secuencias SEQ ID NO. 1 y 2 o en las secuencias SEQ ID NO. 4 y 5 o de los AcMs con una secuencia de aminoácidos que tiene un 98% de identidad con las mismas y que comprende las secuencias SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 3 o las secuencias SEQ ID NO. 4 y SEQ ID NO. 6; en un rango de dosis entre 0.3 mg/Kg de peso a 6 mg/Kg de peso. Dichos AcMs se administran al sujeto al menos una vez, el tiempo que transcurre entre dos administraciones consecutivas es de entre tres y siete días.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Composiciones farmacéuticas

- Los AcM que se emplean en la presente invención se administran como parte de composiciones farmacéuticas que contienen al AcM como principio activo y como un
- 5 excipiente apropiado solución fisiológica tamponada, similar a otras utilizadas para formular AcM para uso endovenoso o subcutáneo. En particular, las secuencias del itolizumab se describen en la patente US 6,572,857 B1 y 8,524,233 y se muestran en detalle en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de proteínas del itolizumab

SEQ ID NO.	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
1	Región variable de cadena pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFKFSRYAMSWVRQAPGKR LEWVATISSGGSYIYPDSVKGRFTISRDNVKNLTLYQMSSLRSED TAMYYCARRDYDLDFDSWGQGT LTVSS
2	Región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDIRSYLTWYQQKPGKAPKT LIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLESDDTATYYCLQHGE SPFTLGSGTKLEIK
3	Región variable de cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDIRSYLTWYQQKPGKAPKT LIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLESDDTATYYCLQHGE SPFTFGSGTKLEIKRA
4	Cadena pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFKFSRYAMSWVRQAPGKR LEWVATISSGGSYIYPDSVKGRFTISRDNVKNLTLYQMSSLRSED TAMYYCARRDYDLDFDSWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHT TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	Cadena	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDIRSYLTWYQQKPGKAPKT

	ligera	LIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLESDDTATYYCLQHGE SPFTLGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
6	Cadena ligera	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDIRSYLTWYQQKPGKAPKT LIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLESDDTATYYCLQHGE SPFTFGSGTKLEIKRARTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPRREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Aplicación terapéutica y métodos de tratamiento

La presente invención se relaciona con el uso de los AcM anti-CD6 en la prevención de una respuesta hiper-inflamatoria que se desencadena por, o afecta el resultado final de procedimientos médicos específicos, entre los que se encuentran: la cirugía cardíaca, cirugía de trasplante pulmonar, cirugía de aneurisma cerebral gigante y, cirugía vascular, oxigenación extracorpórea de membrana (ECMO por sus siglas en inglés), asistencia circulatoria mecánica (ACM), terapias de reemplazo renal como la hemofiltración, diálisis en terapia o iterada, hemodiafiltración, cirugía de control de daño, trauma, politrauma, quemaduras, peritonitis necrotizante, síndrome de respuesta inflamatoria aguda.

Particularmente, se relaciona con el uso en las condiciones arriba mencionadas de los AcM anti-CD6 cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO. 1 (región variable de cadena pesada) y SEQ ID NO. 2 (región variable de cadena ligera) o con secuencias con un 98% de identidad con estas y que comprenden las SEQ ID NO. 1 (región variable de cadena pesada) y SEQ ID NO.3 (región variable de cadena ligera) de acuerdo a la presente invención. Además, con los AcM anti-CD6 que tienen regiones de cadenas pesadas y ligeras que comprenden las secuencias de aminoácidos que se establecen en las SEQ ID NO.4 (cadena pesada) y SEQ ID NO.5 (cadena ligera) o con secuencias con un 98% de identidad con estas de acuerdo a la presente invención. Un AcM anti-CD6 que comprende o consiste de las SEQ ID NO: 4 y 6 se incluye en la presente invención.

El término de Ac anti-CD6 no depletante, utilizado en la presente invención, significa un AcM que reconoce al CD6 y que una vez que se une a este, no induce citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC, por sus siglas en inglés), citotoxicidad celular dependiente de complemento (CDC por sus siglas en inglés) o no promueve de otra manera lisis o muerte de las células que expresan el CD6. Por lo anterior, una ventaja

particular del tratamiento propuesto es la no inducción de inmuno-deficiencia en el paciente, a diferencia de otras terapias basadas en esteroides, AcM u otros inmunosupresores. La preservación de cierta inmuno-competencia en el paciente tratado reduce la posibilidad de emergencia por otras infecciones oportunistas, muy
5 comunes en las terapias intensivas.

Los pacientes que reciben la terapia con AcM anti-CD6 pueden estar ingresados en una sala de terapia intensiva, aunque también pueden estar en una sala convencional o en consulta ambulatoria. Son tributarios del tratamiento con los AcM anti-CD6 pacientes adultos, pediátricos o embarazadas.

- 10 El anticuerpo se aplicará a los sujetos (dichos sujetos son vertebrados, tales como los humanos), por vía intravenosa o subcutánea, en un rango de dosis entre 0.3 mg/Kg de peso y 6 mg/Kg de peso, que se corresponden entre 25 y 420 mg totales respectivamente. El anticuerpo se administrará al menos una vez al paciente y el tiempo entre dos administraciones consecutivas estará entre tres y siete días. La dosis
15 y el esquema a utilizar para diferentes AcM anti-CD6 podrá ser ajustada evaluando la concentración de IL-6 o la capacidad de inhibir *in vitro* o *in vivo* la activación de los linfocitos T y/o B CD6+, o sin inducir su eliminación/depleción como en el caso específico del AcM itolizumab.

- También es objeto de la presente invención la combinación serial o concomitante de
20 los AcM anti-CD6 con anestésicos, sedantes o relajantes así como con terapias antivirales o antibióticos según corresponda con la infección consecuente de la hiperinflamación como consecuencia de la CEC o del trauma.

- Para pacientes en ECMO, asistencia circulatoria mecánica y hemofiltración, se realizará sedación con agentes hipnóticos y en casos necesarios se utilizará relajación
25 muscular con relajantes no despolarizantes.

- Los AcM anti-CD6 se pueden combinar con cualquier anestésico, sedante, relajante o antibiótico permitido para uso en humanos según la condición médica del paciente. Entre los antivirales posibles a combinar estarán, entre otros, la ribavirina, los interferones de tipo 1 y tipo 2, así como inhibidores de proteasa (entre los que se
30 encuentran pero no se limitan el boceprevir, telaprevir, simeprevir), inhibidores de la transcriptasa inversa (entre los que se encuentran pero no se limitan lazidovudina, abacavir, lamivudina, emtricitabina, tenofovir, nevirapina, efavirenz, etravirina), inhibidores de la polimerasa (entre los que se encuentran pero no se limitan el sofosbuvir, ledipasvir, velpatasvir, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, lopinavir,
35 atazanavir, fosamprenavir, tipranavir, darunavir) y de la proteína NS5A (entre los que se encuentran pero no se limitan el elbasvir/grazoprevir) o combinaciones de estos. Los regímenes de antibióticos o antivirales a utilizar serán aquellos convencionalmente

utilizados para cada droga, mientras el régimen de uso del AcM anti-CD6 responderá a lo arriba descrito.

También es objeto de la presente invención la combinación serial o concomitante de un AcM anti-CD6 con agentes terapéuticos que bloquean la interacción entre la IL-6 y el IL-6R o entre la IL-1 y el IL-1R. En particular los tratamientos de las terapias adicionales deben ser lo suficientemente cortos como para contribuir alacáida de la hiper-inflamación, pero sin inducir una inmunosupresión que facilite la expansión de bacterias y virus en el paciente.

En otro aspecto, es objeto de la presente invención la combinación serial o concomitante de un AcM anti-CD6 con eritropoyetina. En particular, en la protección del daño renal fundamentalmente en pacientes con régimen de diálisis.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Perfil inflamatorio (concentraciones de LDH, IL-6 y PCR) de un paciente tratado con itolizumab a dosis de 1.6 mg/kg de peso.

Figura 2. Comparación de concentraciones de IL-6 en pacientes sometidos a cirugía con CEC sin y con el tratamiento con itolizumab a dosis de 1.6 mg/kg de peso.

Figura 3. Concentraciones de PCR en las diferentes condiciones evaluadas en comparación con el tratamiento con itolizumab a dosis de 1.6 mg/Kg de peso. Valor normal <6 pg/L

Figura 4. Concentraciones de LDH en pacientes sometidos a cirugía con CEC no tratados con itolizumab en comparación con el tratamiento con itolizumab a dosis de 1.6 mg/kg de peso. Rango de referencia: 240-480 UI/L

Figura 5. Perfil hepático (concentraciones de ALT, FAL y bilirrubina total) de un paciente tratado con itolizumab a dosis de 1.6 mg/kg de peso. Valores normales: ALT< 40 UI/L, FAL 39-117 UI/L, bilirrubina total < 20µg/L.

Figura 6. Perfil renal (concentraciones de creatinina y urea) de un paciente tratado con itolizumab a dosis de 1.6 mg/kg de peso. Valores normales de creatinina en hombres: 62-106 µmol/L y mujeres: 44-80 µmol/L, urea: 1.7-8.3 µmol/L.

Figura 7. Concentraciones de IL-6 y LDH de un paciente tratado con itolizumab a dosis de 0.3 mg/kg de peso.

Figura 8. Comparación de concentraciones de IL-6 en las diferentes condiciones evaluadas en comparación con el tratamiento con itolizumab a dosis de 0.3 mg/kg de peso.

Figura 9. Concentración de IL-6 y lactato en un paciente post trauma al que se realizó cirugía ortopédica tratado con itolizumab a dosis de 1.6 mg/kg de peso. Valores normales de lactato: 0.5-1.6 mmol/L.

5 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Demostración de la reducción del grado de hiper-inflamación en un paciente con cirugía de sustitución valvular mitral y CEC tratado con itolizumab (1.6 mg/kg de peso).

A un paciente que se sometió a cirugía de sustitución valvular mitral se le administró 1.6mg/kg de peso del AcM itolizumab (100 mg) en 250 mL de solución salina y 2 mg de midazolam como pre-medicación anestésica. Luego de realizada la monitorización básica se colocó una cánula en la arteria radial para monitorización de presión arterial invasiva. Previa monitorización de frecuencia cardíaca, tensión arterial invasiva, electrocardiograma y saturación de oxígeno; se realizó inducción anestésica con lidocaína 70 mg, fentanil 350 µg, midazolam 8 mg, seguido de atracurio 35 mg. Laringoscopia e intubación fácil con tubo endotraqueal 8.0, se acopló a máquina de anestesia en ventilación controlada por volumen. Se colocó una vía venosa central por punción percutánea de la vena yugular interna. El mantenimiento se realizó con anestesia balanceada con isofluorano y una infusión continua de fentanil a razón de 5µg/kg/h, midazolam 0.15 mg/kg/h y atracurio 0.2 mg/kg a demanda. Se administró una solución continua de magnesio 4 mg en una hora.

Apertura esternal sin complicaciones. Se canuló la aorta ascendente y vena cava superior e inferior. Previa heparinización 5mg/kg, se comienza CEC y se mantuvo un flujo medio entre 1.8 y 2.4 L/m² de superficie corporal, con una presión arterial media entre 60 y 70 mmHg. Se clampeó aorta y para la protección miocárdica se utilizó cardioplejía hiperpotasémica. Se realizó sustitución valvular protésica sin complicaciones. Tiempo de clampeo aórtico de 64 minutos. Paciente activa en ritmo sinusal. Medio interno normal, signos vitales dentro de parámetros fisiológicos, sale de *bypass* sin apoyo hemodinámico. Tiempo de CEC 156 minutos. Se revierte heparina.

Concluye cirugía satisfactoriamente. Se traslada el paciente a terapia intensiva intubado, estable hemodinámicamente. Frecuencia cardiaca 76 latidos por minuto, tensión arterial 110/60 mmHg, saturación parcial de O₂ 99%. El paciente evolucionó de forma estable en post-operatorio sin signos ni síntomas de daño orgánico. No hubo infecciones subsecuentes y a los siete días del post-operatorio recibió el alta médica.

Para evaluar la concentración de IL-6, LDH y PCR, ALT, FAL, bilirrubina total, creatinina y urea se tomaron muestras previo a cirugía o tratamiento con itolizumab (0 horas), así como a las 12; 24; 48 y 168 horas.

En el perfil inflamatorio, posterior a la intervención quirúrgica con CEC (Figura 1) se observó a las 12 horas una concentración de IL-6 de 18.6 pg/mL, valor que se encuentra por encima de los valores de referencia (≤ 7 pg/mL); pero muy inferior (9 veces menos) a la media encontrada en el grupo de pacientes sometidos a cirugía con CEC que no recibieron itolizumab (Figura 2) por lo que el tratamiento con itolizumab (1.6 mg/kg de peso) logra controlar el aumento de la concentración de IL-6 que produce la CEC, incluso por debajo de lo que ocurre con la cirugía sola. También, la concentración de PCR aumentó alcanzando el valor máximo a las 24 horas (45.1 pg/L, Figura 1); pero al comparar los resultados con los del grupo de pacientes que necesitaron CEC (Figura 3), se constata que el tratamiento con itolizumab a una dosis de 1.6 mg/Kg de peso, la concentración de PCR aumenta menos (1.8 veces menor). Adicionalmente, el tratamiento con itolizumab (1.6 mg/kg de peso) previno el aumento de las concentraciones de LDH por encima del rango superior de referencia como reflejo de que no hubo daño celular ni orgánico, contrario a lo que sucede en pacientes sometidos a cirugía con CEC (Figura 4). Respecto al perfil hepático (Figura 5), las concentraciones de los parámetros medidos (ALT, FAL, bilirrubina total), siempre se mantuvieron dentro del rango de referencia normal, lo que indica que no hubo daño hepático. Las concentraciones de creatinina y urea se mantuvieron dentro del rango de la normalidad, lo que indicativo que no se detectó daño renal (Figura 6).

Ejemplo 2. Demostración de la reducción del grado de hiper-inflamación en un paciente con cirugía de sustitución valvular mitral tratado con itolizumab (0.3 mg/kg de peso).

A un paciente que se sometió a cirugía de sustitución valvular mitral se le administró 0.3 mg/kg de peso del AcM itolizumab (25 mg) en 50 mL de solución salina y 2 mg de midazolam como pre-medicación anestésica. Luego de realizada la monitorización básica se colocó una cánula en la arteria radial para monitorización de presión arterial invasiva. En salón de operaciones, previa monitorización de frecuencia cardíaca, tensión arterial invasiva, electrocardiograma y saturación de oxígeno; se realizó inducción anestésica con lidocaína 80 mg, fentanil 400 µg, midazolam 8 mg, seguido de atracurio 40 mg. Laringoscopia e intubación fácil con tubo endotraqueal 8.5, se acopló a máquina de anestesia en ventilación controlada por volumen. Se colocó una vía venosa central por punción percutánea de la vena yugular interna. El mantenimiento se realizó con anestesia balanceada con isoflurano y una infusión continua de fentanil a razón de 5 µg/kg/h, midazolam 0.15 mg/kg/h y atracurio 0,2 mg/kg a demanda. Se administró una solución continua de magnesio 4mg en una hora.

Apertura esternal sin complicaciones. Se canuló la aorta ascendente y vena cava superior e inferior. Previa heparinización 5mg/kg, se comienza CEC y se mantuvo un flujo medio entre 1.8 y 2.4 L/m² de superficie corporal, con una presión arterial media entre 60 y 70 mmHg. Se clampeó aorta y para la protección miocárdica se utilizó cardioplejia hiperpotasémica. Se realizó sustitución valvular protésica sin complicaciones. Tiempo de clampeo aórtico de 71 minutos. Paciente activa en ritmo sinusal. Medio interno normal, signos vitales dentro de parámetros fisiológicos, sale de *bypass* sin apoyo hemodinámico. Tiempo de CEC 95 minutos. Se revierte heparina. Concluye cirugía satisfactoriamente. Se traslada el paciente a terapia intensiva intubado, estable hemodinámicamente. Frecuencia cardíaca 80 latidos por minuto, tensión arterial 120/70 mmHg, saturación parcial de O₂ 100%. Para determinar la concentración de IL-6 y LDH se tomaron muestras previo a cirugía o tratamiento con itolizumab (0 horas), 12 y 24 horas. Como se observa en la Figura 7, posterior a la intervención quirúrgica con CEC la concentración de IL-6 aumentó a las 12 horas, mientras que la concentración de LDH se encontró dentro del rango de referencia normal. Al comparar los resultados del efecto del itolizumab (0.3 mg/kg de peso) sobre la concentración de IL-6 respecto a los controles evaluados (Figura 8), también se confirmó una atenuación importante del aumento de esta citocina que produce del proceder quirúrgico por sí solo o que exacerba el paso de la sangre por CEC. No se constataron complicaciones permanentes ni infecciones subsecuentes. A los diez días del post-operatorio el paciente recibe el alta médica. El tratamiento con itolizumab atenuó la respuesta inflamatoria constatada en el seguimiento de la concentración de IL-6y PCR; lo que evidenció prevención del daño celular y orgánico.

Ejemplo 3. Demostración de la reducción del grado de hiper-inflamación previo a la cirugía en un paciente que sufrió accidente de tránsito.

A un paciente que sufrió accidente de tránsito, se recibió en el hospital, aproximadamente 1 hora después, consciente con gran agitación psicomotora, lenguaje claro y coherente con amnesia peri traumática, con estigmas de trauma craneal frontal, y múltiples quemaduras por fricción en miembros superiores y región de hombro izquierdo. Sistema respiratorio: expansibilidad torácica conservada, no estigma de trauma, murmullo vesicular conservado, no estertores, frecuencia respiratoria: 23/min. Cardiovascular: paciente pálida sudorosa con frialdad de piel generalizada. Ruidos rítmicos taquicárdicos de buen tono frecuencia cardíaca 102/min. Abdomen suave depresible no doloroso no reacción peritoneal. En miembro inferior

izquierdo presenta aumento de volumen con deformidad y angulación a nivel del tercio medio del muslo y la pierna con marcada rotación externa y flexión, acortamiento aparente de dicha extremidad. A la palpación se constata una movilidad anormal a nivel del tercio medio de tibia y fémur. Pulsos presentes filiformes, frialdad y sudoración en las extremidades. Sensibilidad conservada y motilidad activa y pasiva conservada. Al evaluar su estado fisiológico se consideró que se encontraba en un estadio *borden-line* de los pacientes lesionados complejos y basados en la Conferencia de Consenso entre el *American College of Chest Physicians* y la *Society of CriticalCare Medicine*, que define que el diagnóstico del SRIS, se caracteriza por la presencia de dos o más de los siguientes signos: Temperatura $< 36^{\circ}\text{C}$ ó $> 38^{\circ}\text{C}$; Frecuencia cardíaca > 90 lat/min; Frecuencia respiratoria > 20 resp/min ó $\text{pCo}_2 < 32$ mmHg y Leucocitos $> 12.000/\text{mm}^3$ ó $< 4.000/\text{mm}^3$ ó $> 10\%$ de formas inmaduras. Se decide administrar el AcM itolizumab (100 mg) a razón 1.6 mg/kg de peso diluido en 250 mL de solución salina fisiológica, en infusión continua con bomba de infusión a durar dos horas en el trans-operatorio. Se realizó enclavado endomedular acerrojado no rimado retrogrado de la fractura de fémur y enclavado endomedular acerrojado no rimado de la fractura de tibia mediante un abordaje único infra rotuliano con un tiempo quirúrgico 1h 27min.

Se tomaron muestras de suero para la determinación de concentración de IL-6 a: 1;3; 6; 12 y 24 horas del accidente.

La disminución de un 50% de la concentración de IL-6 posterior a las 2 horas de la infusión con itolizumab, unido a la estabilización fisiológica del paciente (disminución de la concentración de lactato) permitió realizar una cirugía definitiva en las primeras horas posterior al trauma. En las primeras 24 horas se observó una disminución hasta un 80% de la concentración de IL-6 con mejora de los parámetros humorales, en especial del lactato (Figura 9). Esto unido a la evidente mejoría clínica de la paciente, conllevó a que la paciente no desarrollara un SIRS con la consiguiente prevención de evolución hacia disfunciones orgánicas o fallecimiento. Este hallazgo permite, además, realizar una fijación definitiva entre 48 y 72 horas posteriores al trauma, lo que conlleva a disminuir el tiempo de espera que convencionalmente oscila entre 5 y 10 días; con una correspondiente disminución de la estadía hospitalaria.

USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD6 EN LA PREVENCIÓN DEL DAÑO CELULAR Y ORGÁNICO DERIVADO DE UNA RESPUESTA HIPER-INFLAMATORIA

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo monoclonal (AcM) que reconoce específicamente al CD6, para prevenir el daño celular y orgánico derivado de una respuesta hiper-inflamatoria que se desencadena por procedimientos médicos altamente invasivos, o afecta el resultado final de dichos procedimientos.
2. Uso según la reivindicación 1, donde el AcM es no depletante.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1, donde el AcM se une específicamente al dominio 1 del CD6 y comprende las secuencias SEQ ID NO 1 y 2 o tiene un 98% de identidad con dichas secuencias 1 y 2.
4. Uso según la reivindicación 3, donde el AcM anti-CD6 que tiene un 98% de identidad con las secuencias SEQ ID NO 1 y 2 comprende las SEQ ID NO. 1 y
- 15 SEQ ID NO. 3.
5. Uso según la reivindicación 1, donde el AcM se une específicamente al dominio 1 del CD6 y comprende las secuencias SEQ ID NO 4 y 5 o que tiene un 98% de identidad con dichas secuencias 4 y 5.
6. Uso según la reivindicación 5, donde el AcM anti-CD6 que tiene un 98% de
- 20 identidad con las secuencias SEQ ID NO 4 y 5 comprende las SEQ ID NO. 4 y SEQ ID NO. 6.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde las condiciones que desencadenan o afectan el resultado final de procedimientos médicos específicos se seleccionan del grupo que comprenden:
- 25 - cirugía cardíaca, cirugía de trasplante pulmonar, cirugía de aneurisma cerebral gigante, cirugía vascular, oxigenación extracorpórea de membrana, asistencia circulatoria mecánica, hemofiltración, diálisis renal y hemodiafiltración, cirugía de control de daño, trauma, politrauma, quemaduras, peritonitis necrotizante, síndrome de respuesta inflamatoria
- 30 aguda.
8. Uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en combinación con agentes que se seleccionan del grupo que comprenden: anestésicos, sedantes, relajantes, antivirales, antibióticos, eritropoyetina, agentes que bloquean la interacción entre la IL-6 y el receptor de IL-6 y agentes que bloquean la
- 35 interacción entre la IL1 y el receptor de IL1.

9. Uso según la reivindicación 8, donde la administración de los agentes a combinar con los AcM anti-CD6 se realiza de forma serial o concomitante.
10. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el AcM anti-CD6 es humanizado de isotipo IgG1.
- 5 11. El uso de acuerdo a la reivindicación 10, donde el AcM anti-CD6 es el itolizumab.
12. Un método de tratamiento de un sujeto sometido a CEC que comprende la administración por vía intravenosa o subcutánea del AcM que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO. 1 y 2 o una
- 10 secuencia de aminoácidos con un 98% de identidad con las mismas y que comprende las SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 3 en un rango de dosis entre 0.3 mg/Kg de peso a 6 mg/Kg de peso.
13. Un método de tratamiento de un sujeto sometido a CEC que comprende la administración por vía intravenosa o subcutánea de los AcM que comprenden
- 15 las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO. 4 y 5 o una secuencia de aminoácidos con un 98% de identidad con las mismas y que comprende las SEQ ID NO. 4 y SEQ ID NO. 6 en un rango de dosis entre 0.3 mg/Kg de peso a 6 mg/kg de peso.
14. El método de tratamiento de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 12-13
- 20 donde el AcM anti-CD6 se administra al sujeto al menos una vez, el tiempo que transcurre entre dos administraciones consecutivas será entre tres y siete días.