

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 276**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

A61M 31/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007** **E 07715910 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012** **EP 1996292**

54 Título: **Uso de péptidos para el control de lesiones por radiación**

30 Prioridad:

07.03.2006 US 779896 P

07.06.2006 EP 06076181

07.06.2006 US 811878 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2013

73 Titular/es:

BIOTEMPT B.V. (100.0%)

HOGÉ LINTHORST 1

7958 NZ KOEKANGE, NL

72 Inventor/es:

BENNER, ROBBERT;

KHAN, NISAR AHMED y

CARLTON, RICHARD MICHAEL

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 399 276 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de péptidos para el control de lesiones por radiación

5 SECTOR TÉCNICO

La presente invención se refiere al sector del desarrollo de medicamentos contra lesiones por radiación aguda provocadas por la exposición a ondas electromagnéticas de alta energía (rayos X, rayos gamma) o partículas (partículas alfa, partículas beta, neutrones). Hasta la fecha, no existe ningún fármaco eficaz para mejorar las lesiones por radiación después de la exposición accidental a radiación ionizante.

ANTECEDENTES

Las lesiones por radiación son el daño a los tejidos provocados por la exposición a la radiación. En el presente documento, radiación se refiere a la radiación ionizante provocada por ondas electromagnéticas de alta energía (rayos X, rayos gamma) o partículas (partículas alfa, partículas beta, neutrones). Dicha radiación es emitida por sustancias radiactivas (radioisótopos), tales como uranio, radón y plutonio. Dicha radiación también es producida por fuentes artificiales, tales como rayos X y máquinas de radioterapia. La dosis de radiación se mide en varias unidades diferentes, pero todas se refieren a la cantidad de energía depositada. Las unidades incluyen roentgen (R), gray (Gy) y sievert (Sv). Sievert y gray son similares, excepto que el sievert tiene en cuenta los efectos biológicos de diferentes tipos de radiación. Los dos principales tipos de exposición a la radiación son la irradiación y la contaminación. Muchos de los accidentes por radiación exponen a una persona a ambos.

La irradiación es la exposición a ondas de radiación que pasan directamente a través del cuerpo desde el exterior del cuerpo. La irradiación puede hacer que una persona enferme inmediatamente (enfermedad por radiación aguda). Además, la irradiación, en particular en dosis elevadas, puede dañar el material genético de una persona (ADN), provocando trastornos crónicos (retardados), tales como cáncer y defectos de nacimiento. Sin embargo, la irradiación no hace radioactivos a la persona o sus tejidos. La contaminación es el contacto y la retención del material radiactivo, habitualmente en forma de polvo o líquido. El material radiactivo puede permanecer en la piel, donde se puede caer o ser arrastrado, contaminando a otras personas y objetos. El material también puede ser absorbido por el cuerpo a través de los pulmones, tracto digestivo o entradas por la piel. El material absorbido es transportado a varios lugares en el cuerpo, tales como la médula ósea, donde continúa emitiendo radiación. Esta radiación internalizada no solamente provoca enfermedad por radiación aguda tal como sangrado interno, sino que también puede producir trastornos crónicos tales como cáncer.

Las personas están constantemente expuestas a bajos niveles de radiación natural (radiación de fondo). La radiación proviene del espacio exterior (radiación cósmica), aunque gran parte de ella es bloqueada por la atmósfera de la Tierra. La exposición a la radiación cósmica es mayor para las personas que viven o trabajan en elementos altamente radiactivos, en particular gas radón, también está presentes en muchas rocas y minerales. Estos elementos terminan en una variedad de sustancias, incluyendo alimentos y materiales de construcción. Además, las personas están expuestas a la radiación de fuentes artificiales, incluyendo radiación ambiental que es el resultado de pruebas con armas nucleares y la radiación de varias pruebas médicas y tratamientos. La persona promedio recibe un total de aproximadamente de tres o cuatro mSv (1 mSv = 1/1000 Sv) por año de radiación natural y fuentes artificiales. Las personas que trabajan con materiales radiactivos y con fuentes de rayos X están en riesgo de exposición a altos niveles de radiación. Las personas que reciben tratamientos de radiación para el cáncer pueden recibir unos niveles muy altos de radiación. Las armas nucleares liberan cantidades masivas de radiación. Estas armas no se han utilizado contra personas desde 1945. Sin embargo, una serie de países tienen ahora armas nucleares y varios grupos terroristas también han tratado de obtenerlas, aumentando la posibilidad de que estas armas puedan volver a ser utilizadas.

Los efectos dañinos de la radiación dependen de varios factores, incluyendo la cantidad (dosis) y la duración de la exposición. Una dosis única y rápida de radiación en todo el cuerpo puede ser fatal, pero la misma dosis total administrada durante un periodo de semanas o meses puede tener un efecto mucho menor. Para una dosis dada, el daño genético es más probable con la exposición rápida. Los efectos de la radiación también dependerán de cuanta parte del cuerpo se expone. Por ejemplo, más de 6 Gy generalmente causa la muerte cuando la radiación se distribuye por todo el cuerpo, sin embargo, cuando se concentra en un área pequeña, como en la terapia por radiación para el cáncer, tres o cuatro veces esta cantidad se puede administrar sin daños graves para el paciente en general. La distribución de la radiación también es importante, porque ciertas partes del cuerpo son más sensibles a la radiación. Los órganos y tejidos en los que las células se multiplican rápidamente, tales como los intestinos y la médula ósea, son dañados más fácilmente por la radiación que aquellos en que las células se multiplican más lentamente, tales como los músculos y los tendones. El material genético de las células de esperma y el óvulo puede ser dañado por la radiación. Durante la terapia por radiación para el cáncer, por lo tanto, cada intento se hace para proteger las partes más vulnerables del cuerpo de la radiación, de manera que se pueden administrar dosis altas principalmente al cáncer. La exposición a la radiación produce dos tipos de lesiones: agudas (inmediatas) y crónicas (retardadas). Lesiones por radiación aguda provocan inflamación mediante deterioro endotelial vascular que conlleva a vasos con fugas. Sigue una respuesta vascular y una respuesta celular. La

radiación ionizante deprime la inmunidad y daña el epitelio intestinal, los cuales promueven la translocación microbiana desde los intestinos.

- 5 La radioterapia para el cáncer principalmente produce síntomas en la parte del cuerpo que recibe la radiación. Por ejemplo, en la terapia por radiación para el cáncer rectal, son comunes los calambres abdominales y diarrea debido a los efectos de la radiación en el intestino delgado.

10 La búsqueda de agentes radioprotectores no tóxicos que pueden proteger el tejido normal contra los daños por radiación comenzó poco después de la Segunda Guerra Mundial. La amplia investigación radiobiológica produjo numerosos agentes que, cuando se administran antes de la exposición a la radiación, protegen a animales (principalmente roedores) contra las lesiones por radiación [Prasad K.N. Manual de Radiobiología. 2ª ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1995]. A partir de estos estudios, se puso de manifiesto que los agentes, que secuestran radicales libres y/o causan hipoxia, pueden ser de valor radioprotector. Desafortunadamente, la mayoría de estos compuestos en dosis radioprotectoras resultaron ser tóxicos para los humanos. Con la disminución del riesgo de una confrontación nuclear experimentada durante la evolución de la guerra fría y después, el interés por el estudio de los agentes radioprotectores disminuyó notablemente. Debido al rápido crecimiento de los dispositivos de diagnóstico basados en rayos X y una mayor utilización de procedimientos radiológicos para el diagnóstico precoz de enfermedades, ha aumentado la preocupación acerca del aumento de la frecuencia de mutaciones somáticas y hereditarias que pueden aumentar el riesgo de enfermedades genéticas en las generaciones presentes y futuras. Por lo tanto, se ha hecho imperativo que los tejidos normales estén protegidos contra el potencial daño por radiación sin importar lo pequeño que pueda ser el daño.

25 Comúnmente, los agentes radioprotectores se definen como compuestos que se administran antes de la exposición a la radiación ionizante para reducir sus efectos dañinos, incluyendo la letalidad inducida por radiación [HB Stone y otros, Modelos para la evaluación de agentes destinados a la profilaxis, mitigación y tratamiento de lesiones por radiación. Informe de un Taller NCI, Diciembre 3-4, 2003, Radiat Res 162: 711-728]. Tienen aplicaciones en el terrorismo radiológico, escenarios militares, oncología clínica, viajes espaciales, limpieza de sitios de radiación [RH Johnson, Tratar con el terror del terrorismo nuclear, Health Phys. 87: S3-7, F.A.J. Mettler, G.L. Voelz, Exposición a gran radiación - qué esperar y cómo responder, N Engl J Med 346: 1554-1561, 2001] C.K. Nair, D.K. Parida, T. Nomura, Radioprotectores en radioterapia, J Radiat Res (Tokio) 42: 21-37, J.K. Waselenko, T.J. MacVittie, W.F. Blakely, N. Pesi, A.L. Wiley, W.E. Dickerson, H. Tsu, D.L. Confer, C.N. Coleman, T. Seed, P. Lowry, J.O. Armitage, N. Dainiak, Manejo médico del síndrome por radiación aguda: Recomendaciones del Grupo Estratégico Nacional de Radiación de Arsenales de Trabajo, Ann Intern Med 140: 1037-1051]. Recientemente, la Oficina de Política Científica y Tecnológica de EE.UU. y el Consejo de Seguridad Nacional han hecho que el desarrollo de nuevos radioprotectores sea una prioridad de investigación principal. Aunque los radioprotectores sintéticos, tales como los aminotioles, han dado los más altos factores de protección, por lo general son más tóxicos que los protectores de origen natural. En general, también se ha dado a conocer que los mejores agentes radioprotectores resultan en la mayor toxicidad conductual.

40 En un escenario de radiación militar, la mitigación eficaz de las consecuencias para la salud inducidas por la radiación y los efectos de degradación del rendimiento pueden reducir la carga de víctimas en las instalaciones de tratamiento médico, mantener una fuerza operativa más eficaz después de un evento de exposición a la radiación, permitir a los comandantes que realicen operaciones en entornos de radiación de campo con un menor riesgo de disminución del rendimiento debido a lesiones tisulares agudas, y reducir el impacto psicológico negativo sobre el personal encargado de operar en ambientes contaminados. El radioprotector ideal sería no tóxico, no degradaría el rendimiento y sería eficaz después de una sola administración, particularmente cuando se requiere entrada acelerada en un área con peligros potenciales de radiación externa.

50 En un artículo científico (Landauer y otros, OTAN RTG-099 de 2005) presentados en la reunión del Grupo de Tareas de Investigación de Factores Humanos y Medicina de la OTAN 099 "Bioefectos de la radiación y contramedidas", celebrada en Bethesda, Maryland, EE.UU., Junio 21-23, 2005, y publicado en AFRRI CD 05-2, se presentó la genisteína como que daba prevención de la mortalidad inducida por radiación gamma en ratones, teniendo un "Factor de reducción de dosis" (DRF) a la mejor dosis (200 mg/kg; que dio como resultado la mayor tasa de supervivencia cuando se administró a los ratones 24 horas antes de la irradiación) de 1,16. Cuando se administró 1 hora antes de la irradiación a todo el cuerpo (WBI), no se observó radioprotección. Otros estudios que describen la actividad de protección de la radiación de un fármaco de nombre en código ON-01210 que se presentaron en la 51 Sociedad de Investigación sobre la Radiación (Abril, 2004), muestran que este fármaco en particular ON-01210 (al igual que otros fármacos que se encuentran actualmente bajo investigación para exposición a la radiación) presenta protección sólo si se administra antes de la exposición a la radiación. Este medicamento en particular tiene un componente sulfhidrido (4 carboxistiril-4-clorobencilsulfona) que funciona como antioxidante, secuestrando los radicales libres que se generan como daños de radiación de las células.

Además, tal como se indica en el informe anual al Congreso del Departamento de Defensa de EE.UU. (Marzo 2005; http://medchembio.amedd.army.mil/docs/CBDP_Report_To_Congress.pdf), en la actualidad, no existen agentes farmacéuticos no tóxicos comercialmente disponibles o capacidades de diagnóstico adecuadas para su utilización en entornos operativos militares. Un compuesto de aminotiol, amifostina, está aprobado por la FDA para su

utilización en pacientes que reciben quimioterapia o terapia de radiación, pero sus efectos secundarios tóxicos degradantes del rendimiento de tóxicos prohíben su utilización en una fuerza preparada para el combate, y su vía de administración intravenosa requiere que estén disponibles profesionales médicos. Otros agentes farmacológicos, tales como citoquinas hematopoyéticas para el tratamiento de lesiones de médula ósea, se pueden utilizar fuera de las indicaciones sobre una base caso por caso por un médico individual, pero las restricciones regulatorias para dicha utilización, lo hacen poco práctico para el tratamiento de un gran número de víctimas durante operaciones militares. Los antibióticos se utilizan comúnmente para tratar las secuelas infecciosas de lesiones radiológicas, pero deben seleccionarse de manera adecuada para tratar eficazmente infecciones sistémicas exógenas y endógenas, mientras que sólo afectan poco a las bacterias anaeróbicas intestinales. Al abordar la cuestión de las contramedidas médicas alternativas limitadas en la actualidad, un nuevo compuesto, 5-androstenediol (5-AED; Whitnall y otros, Experimental Biology and Medicine 226:625-627 (2001)), ha sido objeto de estudio en el Instituto de Investigación Radiobiológica de las Fuerzas Armadas (AFRRI). Una vez más, el compuesto mostró buena eficacia como radioprotector cuando se administró antes de la exposición a la irradiación en un modelo de ratón. Se observaron mejoras en la supervivencia cuando AED se administró mediante inyección sc entre 24 h antes y 2 h después de la irradiación gamma de los ratones. Se calculó un factor de reducción de dosis de 1,3 a partir de las curvas de supervivencia "probit" para la administración antes de WBI. Se observó protección en los ratones machos y hembras, con y sin inoculación posterior con dosis letales de *Klebsiella pneumoniae*. No se observó protección con un número de otros esteroides: dehidroepiandrosterona (DHEA), 5-androsten-3B, 7B, 17B-triol (AET), androstenediona o estradiol. Sin embargo, estudios ampliados en un modelo de primate no humano (NHP) durante el último año en la preparación de la solicitud IND demostró que 5-AED es mucho menos eficaz que en el modelo de ratón cuando se administra como un radioprotector, pero dio una buena eficacia en el modelo NHP cuando se administra terapéuticamente en dosis en serie poco después de la irradiación.

Enfermedad aguda por radiación. La enfermedad aguda por radiación generalmente se presenta en personas cuyo cuerpo entero ha sido expuesto a la radiación. La enfermedad por radiación aguda progresa a través de varias etapas, comenzando con los primeros síntomas (pródromo) y seguido de un período sin síntomas (etapa latente). Siguen varios síndromes (patrones de los síntomas), dependiendo de la cantidad de radiación que recibió la persona. Cuanto mayor es la cantidad de radiación, más graves son los síntomas y más rápida la progresión desde los primeros síntomas hasta el síndrome real. Los síntomas y el transcurso del tiempo son consistentes de una persona a otra para una cantidad dada de exposición a la radiación. Los médicos pueden predecir la exposición a la radiación de una persona por el momento y la naturaleza de los síntomas. Los médicos dividen los síndromes de radiación aguda en tres grupos basados en el sistema de órganos principalmente afectado, aunque existe un solapamiento entre estos grupos.

El síndrome hematopoyético es causado por los efectos de la radiación sobre la médula ósea, el bazo y los ganglios linfáticos - los sitios primarios de producción de células sanguíneas (hematopoyesis). La pérdida de apetito (anorexia), letargia, náuseas y vómitos comienzan de 2 a 12 horas después de la exposición a 2 Gy o más de radiación. Estos síntomas se resuelven en 24 a 36 horas después de la exposición, y la persona se siente bien durante una semana o más. Durante este período sin síntomas, las células que producen sangre en la médula ósea, el bazo y los ganglios linfáticos comienzan a consumirse y no son reemplazadas, lo que lleva a una escasez severa de leucocitos en la sangre, seguido de una disminución de plaquetas y, a continuación, de eritrocitos. La escasez de leucocitos puede conllevar a infecciones graves. La escasez de plaquetas puede causar hemorragias incontroladas. La escasez de eritrocitos (anemia) provoca fatiga, debilidad, palidez y dificultad de la respiración durante un esfuerzo físico. Después de cuatro o cinco semanas, si el paciente sobrevive, las células de la sangre comienzan a producirse otra vez, pero la persona se siente débil y cansada durante meses.

El síndrome gastrointestinal es debido a los efectos de la radiación sobre las células que recubren el tracto digestivo. Comienzan las náuseas, vómitos y diarreas de 2 a 12 horas después de la exposición a 4 Gy o más de radiación. Los síntomas pueden conducir a deshidratación severa, pero remiten al cabo de dos días. Durante los próximos cuatro o cinco días, la persona se siente bien, pero las células que recubren el tracto digestivo, que normalmente actúan como una barrera protectora, mueren y se pierden. Después de este tiempo, vuelve la diarrea grave - a menudo con sangre -, resultando, una vez más, en deshidratación. Las bacterias del tracto digestivo invaden el cuerpo, produciendo infecciones graves. Las personas que han recibido esta cantidad de radiación también es probable que desarrollen el síndrome hematopoyético, que resulta en sangrado e infección y aumenta su riesgo de muerte.

El síndrome cerebrovascular (cerebro) se produce cuando la dosis total de radiación supera los 20 a 30 Gy. Una persona desarrolla rápidamente confusión, náuseas, vómitos, diarrea con sangre y shock. En cuestión de horas, la presión arterial disminuye, acompañada de convulsiones y coma. El síndrome cerebrovascular se considera siempre fatal.

Efectos crónicos de la radiación. Los efectos crónicos de la radiación son el resultado de daños en el material genético de las células en división. Estas alteraciones pueden producir anomalías en el crecimiento celular, tal como cáncer. En animales severamente irradiados, se ha demostrado que el daño a las células reproductivas conduce a defectos en la descendencia (defectos de nacimiento). Sin embargo, se han observado pequeñas deformidades resultado de la irradiación en los descendientes de los sobrevivientes de las explosiones nucleares en Japón. Puede

ser que la exposición a la radiación por debajo de un cierto nivel (desconocido) no alteran el material genético de manera suficiente para causar defectos de nacimiento.

Se sospecha que hay lesiones por irradiación cuando una persona enferma después de haber recibido terapia de radiación o ha estado expuesta a radiación en un accidente. No hay pruebas específicas para diagnosticar la enfermedad, aunque se pueden utilizar algunos exámenes para detectar la infección, recuento sanguíneo bajo, o mal funcionamiento de un órgano. Para determinar la severidad de la exposición a la radiación, los médicos miden el número de linfocitos (un tipo de glóbulos blancos) en la sangre. Cuanto menor sea el recuento de linfocitos después de 48 horas de la exposición, peor es la exposición a la radiación.

La contaminación radiactiva, a diferencia de la irradiación, se puede determinar mediante una inspección del cuerpo de una persona con un contador Geiger, un dispositivo que detecta la radiación. También se comprueba la radiactividad de los frotis de nariz, garganta y heridas.

El resultado de las lesiones por radiación depende de la dosis, velocidad de la dosis (rapidez en que se ha producido la exposición), y la distribución en el cuerpo, así como el estado de salud subyacente de la persona. En general, la mayoría de las personas que han recibido más de 6 Gy de WBI mueren de síndrome gastrointestinal. Dado que los médicos probablemente no saben la cantidad exacta de radiación que ha recibido una persona, por lo general juzgan el resultado por los síntomas de la persona. El síndrome cerebrovascular es fatal en cuestión de horas a unos pocos días. El síndrome gastrointestinal generalmente es fatal en cuestión de tres a diez días, aunque algunas personas sobreviven durante unas pocas semanas. Muchas personas que reciben atención médica adecuada sobreviven al síndrome hematopoyético, dependiendo de la cantidad total de radiación, y los que no sobreviven generalmente mueren después de 8 a 50 días.

La irradiación no tiene un tratamiento de emergencia en la actualidad, pero los médicos vigilan de cerca a la persona para determinar el desarrollo de los diversos síndromes y tratan los síntomas que se presentan. También, y desafortunadamente, existen muy pocos productos médicos para hacer frente a la variedad de efectos tóxicos agudos y a largo plazo que pueden resultar de un ataque nuclear o radiológico. La contaminación requiere la retirada inmediata del material radiactivo para evitar que sea absorbido por el cuerpo. La piel contaminada con materiales radiactivos debe ser lavada inmediatamente con abundante agua y jabón o con una solución diseñada para este fin, cuando esté disponible. Las pequeñas heridas punzantes deben limpiarse enérgicamente para eliminar todas las partículas radiactivas, aunque la frotación puede causar dolor. El pelo contaminado se corta, no se afeita – el afeitado puede desgastar la piel y permitir que la contaminación entre en el cuerpo. La frotación continúa hasta que el contador Geiger muestra que la radiactividad ha desaparecido. Si una persona ha ingerido recientemente material radiactivo, se induce el vómito. Algunos materiales radiactivos tienen antídotos específicos que pueden impedir la absorción del material ingerido. La mayoría de dichos antídotos se dan sólo a personas expuestas a contaminación radiactiva significativa, tales como un accidente del reactor principal o una explosión nuclear. El yoduro de potasio evita que la glándula tiroides absorba el yodo radiactivo y disminuye el riesgo de cáncer de tiroides. Otros fármacos, tales como ácido dietilentriamina pentaacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la penicilamina, pueden administrarse por vía intravenosa para eliminar ciertos elementos radiactivos después de haber sido absorbidos.

Cuando no se sospecha la contaminación, las náuseas y los vómitos pueden reducirse tomando medicamentos para evitar los vómitos (antieméticos), estos medicamentos se administran rutinariamente a personas sometidas a radioterapia. La deshidratación se trata con la administración de líquidos por vía intravenosa.

Las personas con el síndrome gastrointestinal o hematopoyético se mantienen aisladas, de modo que no entran en contacto con microorganismos infecciosos. Se realizan transfusiones de sangre e inyecciones de factores de crecimiento (tales como la eritropoyetina y factor estimulante de colonias) que estimulan la producción de células sanguíneas, para disminuir la hemorragia y aumentar el recuento de sangre. Si la médula ósea está muy dañada, estos factores de crecimiento son ineficaces y a menudo se lleva a cabo el trasplante de médula ósea, aunque la tasa de éxito es baja.

Las personas con el síndrome gastrointestinal requieren antieméticos, la administración de líquidos por vía intravenosa y sedantes. Algunas personas pueden ser capaces de comer una dieta blanda. Se administran antibióticos, tales como neomicina, para destruir bacterias en el intestino que pueden invadir el cuerpo. Los antibióticos, así como los fármacos antifúngicos y antivirales se administran por vía intravenosa cuando sea necesario. El tratamiento para el síndrome cerebrovascular tiene como objetivo proporcionar comodidad para aliviar el dolor, la ansiedad y las dificultades para respirar. Se administran medicamentos para controlar las convulsiones.

Las personas con efectos crónicos de la radiación o trastornos causados por la terapia de radiación reciben tratamiento dirigido a sus síntomas. Las llagas o úlceras se pueden eliminar o reparar quirúrgicamente y se puede ayudar a cicatrizar con el uso de la terapia de oxígeno de alta presión (hiperbárico). La leucemia inducida por la radiación se trata con quimioterapia. Las células sanguíneas pueden ser reemplazadas mediante transfusiones. Ningún tratamiento puede revertir la esterilidad, pero los bajos niveles de hormonas sexuales como resultado de funcionamiento anormal de los ovarios y testicular pueden ser tratados con hormonas de reemplazo. Los

investigadores actualmente están estudiando las formas de prevenir o reducir las lesiones del tejido normal inducida por la radiación utilizando citoquinas, factores de crecimiento, y varias terapias diferentes. Se ha demostrado que la amifostina o pilocarpina-HCl disminuye la gravedad de la sequedad de boca (xerostomía) en personas con cáncer de cabeza y cuello tratados con terapia de radiación.

Los estudios clínicos y experimentales de los efectos agudos y tardíos de la radiación sobre las células han mejorado nuestro conocimiento de la radioterapia y ha llevado a la optimización de los programas de tratamiento de radiación y a modos más precisos de administración de la radiación. Sin embargo, como los tejidos normales y cancerosos tienen una respuesta similar a la exposición a la radiación, las lesiones inducidas por radiación en los tejidos normales puede presentarse ya sea durante o después de la finalización del tratamiento de radioterapia. Los estudios sobre los AINE y las prostaglandinas han demostrado de hecho algunas pruebas de radioprotección. Ambos tienen el potencial de aumentar la supervivencia de las células, pero por mecanismos totalmente diferentes. Los estudios de la cinética de células revelan que las células en la fase de mitosis (M) y tardía G2 del ciclo celular son generalmente las más sensibles a la radiación en comparación con células en la fase S temprana y G1/G0. Además, la radiación conduce a un retraso mitótico en el ciclo celular. Por lo tanto, los agentes químicos que o bien limitan la proporción de células en las fases M y G2 del ciclo celular o aumentan el crecimiento rápido de las células, en principio, podrían ser explotados para su utilización potencial como radioprotectores del tejido normal durante la irradiación. Los AINE han demostrado que ejercen efectos anticáncer al causar la detención del ciclo celular, desplazando las células hacia un estado quiescencia (G0/G1). El mismo mecanismo de acción se observó en la radioprotección de tejidos normales. Un aumento en las concentraciones de ácido araquidónico después de la exposición a los AINE también conduce a la producción de una ceramida inductora de apoptosis. Los AINE también elevan el nivel de la superóxido dismutasa en las células. La activación de las proteínas de choque de calor por los AINE incrementa la supervivencia celular mediante la alteración de la expresión de citoquinas. También se ha sugerido un papel para los AINE con respecto a la inhibición de la proliferación celular, posiblemente por un mecanismo de anti-angiogénesis. Varios estudios *in vivo* han proporcionado evidencias que sugieren que los AINE pueden proteger los tejidos normales de las lesiones por radiación. Las prostaglandinas no regulan el ciclo celular, pero tienen una serie de efectos sobre el crecimiento y la diferenciación celular. PGE2 media la angiogénesis, lo que aumenta el suministro de oxígeno y nutrientes, esenciales para la supervivencia celular y el crecimiento. En consecuencia, PGE2 a concentraciones plasmáticas suficientemente elevadas puede aumentar la supervivencia celular mediante la inhibición de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL-1 β . Por lo tanto, PGE2 actúa como un modulador, en vez de un mediador, de la inflamación. Estudios prospectivos han sugerido la utilización potencial de misoprostol, un análogo de PGE1, antes de la irradiación, en la prevención de los efectos secundarios inducidos por la radiación. La comprensión actual de la farmacología de los AINE y las prostaglandinas muestra cierto potencial para reducir al mínimo los efectos adversos de la radiación sobre el tejido normal cuando se utilizan de forma preventiva.

Además de inhibir de forma transitoria la progresión del ciclo celular y esterilizar aquellas células capaces de proliferar, la irradiación perturba la homeostasis afectada por mediadores endógenos de la comunicación intercelular (componente humoral de la respuesta de los tejidos a la radiación). Los cambios en los niveles de los mediadores pueden modular los efectos de la radiación, ya sea ayudando a un retorno a la normalidad (por ejemplo, a través de un aumento de los factores de crecimiento específicos de linaje celular de tipo H) o agravando los daños. Este último modo se ilustra con los informes sobre los cambios en los niveles de eicosanoides después de la irradiación y en los resultados de tratamiento empírico de las lesiones por radiación con fármacos antiinflamatorios. Los efectos prodrómicos, agudos y crónicos de la radiación están acompañados por la producción excesiva de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos). Estos mediadores endógenos de reacciones inflamatorias pueden ser responsables de la vasodilatación, vasoconstricción, aumento de la permeabilidad microvascular, trombosis y quimiotaxis observadas después de la exposición a la radiación. Los glucocorticoides inhiben la síntesis de eicosanoides principalmente al interferir con la fosfolipasa A2, mientras los fármacos antiinflamatorios no esteroideos evitan la síntesis de prostaglandina/tromboxano mediante la inhibición de la ciclooxigenasa. Cuando se administra después de la irradiación sobre una base empírica, los fármacos que pertenecen a ambos grupos tienden a atenuar una gama de efectos prodrómicos, agudos y crónicos de la radiación en el hombre y animales.

La patente de EE.UU. 5.380.668 de Herron (10 de enero, 1995), da a conocer, entre otras cosas, varios compuestos que tienen actividad de unión antigénica de hCG. Los oligopéptidos descritos en dicho documento se describen generalmente para su utilización en métodos de diagnóstico. Varias patentes y solicitudes de patente de Gallo y otros (por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.677.275 (correspondiente a WO 96/04008 A1), la patente de EE.UU. 5.877.148 (que también corresponde a WO 96/04008 A1), WO 97/49721 A1, la patente de EE.UU. 6.319.504 (correspondiente a WO 97/49373), la solicitud patente de EE.UU. 2003/0049273 A1 (también correspondiente a WO 97/49373), la patente de EE.UU. 5.968.513 (correspondiente a WO 97/49418), la patente de EE.UU. 5.997.871 (correspondiente a WO 97/49432), la patente de EE.UU. 6.620.416, la patente de EE.UU. 6.596.688, WO 01/11048 A2, WO 01/10907 A2, y la patente de EE.UU. 6.583.109) se refieren a varios oligopéptidos y su utilización, entre otras cosas, en "la inhibición de la infección por VIH", "el tratamiento o prevención de la infección por VIH", "el tratamiento o prevención del cáncer", "el tratamiento o prevención de una afección que se caracteriza por la pérdida de masa celular corporal", "el tratamiento o prevención de una afección asociada con angiogénesis patológica", "el tratamiento o prevención de deficiencia hematopoyética", "terapia génica *ex vivo*", "expansión de células de la

sangre *in vitro*," y/o "proporcionar células de la sangre a un sujeto". Como se describe en la Publicación Internacional PCT Núm. WO 03/029292 A2 (publicada en Abril 10, 2003), la Publicación Internacional PCT Núm. WO 01/72831 A2 (publicada el 04 de octubre 2001), y las Publicaciones de Solicitudes de Patente de EE.UU. 20020064501 A1 (publicada el 30 de mayo, 2002), 20030119720 A1 (publicada el 26 de junio, 2003), 20030113733 A1 (publicada el 19 de junio, 2003), y 20030166556 A1 (publicada el 4 de septiembre, 2003), la Solicitud de Patente de EE.UU. 11/249, 541, presentada el 13 de octubre, 2005, Solicitud Internacional Núm. PCT/EP2005/003707, presentada el 8 de abril de 2005, solicitud de patente EE.UU. Núm. 10/821,256, presentada el 8 de abril de 2004, Solicitud de Patente EE.UU. 10/262.522, presentada el 30 de septiembre de 2002, la Solicitud Internacional PCT/NL01/00259 (Publicación Internacional Núm. WO 01/72831 A2) presentada el 3 de marzo de 2001, la Patente de EE.UU. 6.844.315 y la Patente de EE.UU. 6.921.751, las composiciones que contienen algunos de los oligopéptidos descritos en el presente documento tienen actividad inmunorreguladora útil, por ejemplo, en el tratamiento de la sepsis y de otros estados de enfermedad y afecciones.

La presente invención se refiere a la forma innata del cuerpo de modular procesos fisiológicos importantes y se basa en los conocimientos dados a conocer en las Publicaciones Internacionales PCT WO99/59617 y WO01/72831 y la Solicitud Internacional PCT PCT/NL02/00639. Estas solicitudes describen pequeños péptidos reguladores de genes que están presentes en mujeres embarazadas y se derivan de la descomposición proteolítica de las gonadotropinas placentarias, tal como hCG. Estos productos de degradación a menudo son sólo de 2 a 6 aminoácidos de longitud y han demostrado tener actividad inmunológica sin igual, que se ejerce mediante la regulación de la expresión de los genes que codifican mediadores inflamatorios tales como citoquinas. Sorprendentemente, se ha encontrado que la descomposición de hCG proporciona una cascada de péptidos que ayuda a mantener la homeostasis inmunológica de una mujer embarazada. Estos péptidos equilibran el sistema inmunológico para asegurar que la madre permanece inmunológicamente sana, mientras que su feto no es rechazado prematuramente durante el embarazo, sino que es llevado de forma segura al momento del nacimiento.

Además, la presente invención se refiere a la solicitud de Patente de EE.UU. 10/821.240 que da a conocer métodos para la detección y la identificación de más péptidos reguladores de genes pequeños y utilizar los resultados de dichas detecciones, por ejemplo, con péptidos derivados de un péptido de referencia. Por ejemplo, los péptidos a ser analizados se derivaron de la proteína C reactiva (CRP) (por ejemplo, CRP humana), dichos péptidos incluyen, LTSL, FVLS, NMWD, LCFL, MWDF, FSYA, FWVD, AFTV y WDFV, péptidos derivados de beta-catenina (por ejemplo, CTNB humana), tales como GLLG, TAPS, VCQV, CLWT, VEIQL, GALH, LGTL, TLVQ, QLLG, YAIT, LCEL, GLIR, APSL, ITTL, QALG, HPPS, GVLC, LCPA, LFYA, NIMR, NLIN, LHPP, LTEL, SPIE, VGGI, QLLY, LNTI, LWTL, LYSP, YAMT, LHVL, TVLR y LFYA, péptidos derivados de beta-hCG (por ejemplo, CG humana), tal como GLLLLLLS, MGGTWA, TWAS, TLAVE, RVLQ, VCNYRDV, FESI, RLPG, PRGV, NPVS, YAVALS, LTCDDP, EMFQ, PVVS, VSYA, GVLP, FQGL, y AVAL; péptidos derivados de la tirosina quinasa de Bruton (por ejemplo, BTK humana), tales como LSNI, YVFS, LYGV, YVVC, FIVR, NILD, TIMY, LESI, FLLT, VFSP, FILE, TALK, FWID, MWEI, QLLE, PCFW, VHKL, YGV, LESI, LSNI, YVFS, IYSL, y NILD, y péptidos derivados de la metaloproteinasa de la matriz-2 (por ejemplo, MM02 humana), tales como FKGA, FFGL, GIAQ, LGCL, YWIY, AWNA, ARG, PFRF, APSP, CALLS, GLPQ, TFWP, AYYL, FWPE, CLLG, FLWC, RIIG, WSDV, PIIK, GLPP, RALC, LNTF, LSHA, ATFW, PSPI, AHEF, WRTV, FVLK, VQYL, KFFG, FPFR, IYSA y FDGI y otros.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al sector del desarrollo de fármacos contra las lesiones por radiación aguda causadas por la exposición a ondas electromagnéticas de alta energía (rayos x-fotones y/o rayos gamma naturales) y/u otras partículas ionizantes de alta energía (partículas alfa, partículas beta, neutrones, protones, mesones pi). Hasta la fecha, no existe ningún medicamento eficaz para mejorar las lesiones por radiación después de la exposición accidental a la radiación ionizante, o después de un daño a los tejidos sanos durante la radiación terapéutica o agentes radiomiméticos, ni existe un medicamento profiláctico eficaz para prevenir o minimizar dichas lesiones cuando se administra antes el evento (por ejemplo, para los primeros respondedores). Los presentes inventores sorprendentemente han observado que péptidos no tóxicos relativamente pequeños pueden ser eficaces como fármacos contra el daño por radiación. Es importante destacar que los péptidos anti-radiación de la presente invención no sólo son útiles como agentes profilácticos, sino también pueden proteger cuando se administran varias horas después de la exposición a la radiación. Esto los hace muy adecuados para su utilización en un escenario de radiación militar, por ejemplo, cuando se trata del terror del terrorismo nuclear. La presente invención da a conocer la utilización de un péptido, o un análogo funcional del mismo, menor de 30 aminoácidos seleccionado del grupo que comprende VVC,LAG, AQQ, LQGV, QVVC, MTRV, AQQV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, EMFQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG, YAIT, APSL, ITTL, QALG, GVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNL, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPG, LQGA, LCFL, TLAVE, VEGNL, LNEAL, VLPALP, MGGTWA, LTCDDP, VLPAPLQ, VCNYRDV, CPRGVNP, QPLAPLVG y DINGFLPAL, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que sufre o se cree que sufre de lesiones por radiación. Preferentemente, dicho péptido se administra a dicho sujeto después de la radiación, es decir, seguido de la exposición de dicho sujeto a una fuente de radiación. En particular, la presente invención da a conocer péptidos anti-radiación que tienen un factor de reducción de dosis (DRF) contra la irradiación aguda de todo el cuerpo, como mínimo, de 1,10, siendo dicho DRF determinable mediante pruebas de que dosis de irradiación de todo el cuerpo (WBI) resulta en un 50% de mortalidad a los 30 días (LD50/30) en un grupo de prueba de roedores de

experimentación (por ejemplo, ratones) tratados con dicho péptido inmediatamente o hasta 72 horas después de WBI, frente a la dosis de WBI que resulta en un 50% de mortalidad a los 30 días (LD50/30) en un grupo de control no tratado, y en el que el DRP se calcula dividiendo la dosis de radiación LD50/30 de los animales tratados con el péptido entre la dosis de radiación LD50/30 de los animales tratados con vehículo.

Los agentes relacionados actualmente con radioprotección son de naturaleza no peptídica o comprenden proteínas grandes, tales como citoquinas. La presente invención da a conocer que los péptidos, tales como MTRVLQGVLP ALPQVVC, que son menores de 30 aminoácidos son útiles para la protección contra las lesiones por radiación y el tratamiento de la misma. Por primera vez se muestra que un fármaco péptido es capaz de reducir los efectos dañinos de la radiación cuando se administra después que ha tenido lugar la exposición a la radiación. Por ejemplo, el péptido anti-radiación se compone de hasta 29, hasta 28, hasta 27, hasta 26, hasta 25, hasta 24, hasta 23, hasta 22, hasta 21, hasta 20, hasta 19, hasta 18, hasta 17, hasta 16 o hasta 15 aminoácidos.

Sin embargo, es preferente que dicho péptido sea menor de 15 aminoácidos. Por ejemplo, preferentemente el péptido anti-radiación consiste en hasta 14, hasta 13, hasta 12, hasta 11, hasta 10, hasta 9 o hasta 8 aminoácidos. Algunos ejemplos de péptidos útiles son LPGCPRGVNPVVS, DINGFLPAL y QPLAPLVG. Sin embargo, cuando los péptidos se utilizan para la automedicación, por ejemplo, como se da a conocer en el presente documento con un autoinyector, desde un punto de vista de la seguridad, es preferente que dicho péptido sea menor de 7 aminoácidos. Dicho péptido, por lo general, no se une a los receptores de MHC, lo que disminuye el riesgo de desarrollar autoinmunidad iniciada por una respuesta inmune contra el péptido administrado.

Este tamaño de menos de 7 aminoácidos (aa) también es preferente en particular debido a que se determinó (cuando se comparan los péptidos derivados del proteoma humano con los derivados de proteomas de patógenos, en particular de los virus o bacterias (Burroughs y otros, Immunogenetics, 2004, 56: 311-320)) que con un tamaño de péptido de 7 aa sólo se encuentra un 3% de solapamiento entre sí o no propio. Para péptidos de 6 aa, que se superponen en el propio humano con agentes patógenos no propios se determinó que era de un 30%, para los péptidos de 5 aa, un 90%, y para péptidos de 4 aa de longitud (y más pequeños), se determinó la superposición de un 100% entre los péptidos presentes en el proteoma humano y los péptidos presentes en el proteoma de patógenos. Basándose en estos datos, ahora se reconoce en el presente documento que cuando no está presente la diferencia propia-no propia, el riesgo de reacciones inmunes adversas, tales como choque anafiláctico, disminuye notablemente, lo cual es una clara ventaja cuando personas no médicamente capacitadas administren cualquier fármaco a ellos mismos o a los demás.

Desde el punto de vista de la prevención de reacciones adversas, tales como el shock anafiláctico, por lo tanto, es preferente que el péptido consista de 2 a 6 aminoácidos, más preferentemente consista de 3 a 5 aminoácidos, y más preferentemente consista de 3 ó 4 aminoácidos. Desde el punto de vista de la actividad, sobre la base del conocimiento general de que la actividad es mayor al aumentar el tamaño del péptido, aunque sólo sea para resistir la proteólisis total más tiempo, por lo cual los fragmentos metabólicos de 3 aa todavía tienen actividad, en el presente documento es preferente que dicho péptido consista de 4 aminoácidos. Las composiciones descritas anteriormente y a continuación se utilizan preferentemente para el tratamiento de lesiones agudas por radiación.

La utilización de péptidos para la protección contra las lesiones por radiación se ha propuesto en la técnica anterior. Las solicitudes de patentes japonesas JP09157291 y JP09157292 describen secuencias de péptidos específicas 6-mer y 9-mer que tienen un efecto inhibitorio *in vitro* sobre el oxígeno activado, acciones de secuestro de radicales libres de oxígeno activado y actividad antioxidante. Se ha especulado que los péptidos son útiles *in vivo* para suprimir los efectos adversos de los diversos tipos de eventos conocidos que están asociados con la formación de oxígeno activo, incluyendo el daño por radiación. Se llevaron a cabo experimentos de radiación no *in vivo*.

El documento JP09176187 da a conocer un análogo de péptido 6-mer que contiene histidina que tiene actividad de secuestro de oxígeno. La administración peritoneal de un péptido a 660 mg / kg de peso corporal 20 minutos antes de la irradiación aumentó la tasa de supervivencia de los ratones a partir del 10% en el grupo de control a 70% en el grupo tratado. No se llevaron a cabo experimentos *in vivo* posteriores a la irradiación.

El documento WO2006/032269 da a conocer un homogeneizado de células de la sangre cuyos componentes que tienen un peso molecular de más de 3 kDa se han eliminado. Se ha informado que el homogeneizado es adecuado para mejorar la respuesta inmune celular en un sujeto. Entre una larga lista de diversas enfermedades inmunológicas y condiciones patológicas, se propone que el homogeneizado se puede administrar a un paciente de una manera profiláctica en un tratamiento que utiliza agentes quimioterapéuticos y/o radiación con el fin de optimizar el estado general del paciente. Cabe señalar que el estudio no involucra ningún experimento de radiación. Además, aunque el homogeneizado probable comprende entre otros una mezcla de proteínas, la identidad del componente o componentes activos no está clara en absoluto y pueden muy bien ser de naturaleza no proteínica. En cualquier caso, no se han aislado o identificado péptidos distintos en el mismo.

El documento EP 0572688 da a conocer un péptido específico que comprende 14 residuos de aminoácido que se encontró que a 20 mg/kg de peso corporal confiere protección en ratones contra la radiación de todo el cuerpo. El efecto se observó solamente cuando el compuesto se aplicó 1 hora antes de la radiación. Sin embargo, no se

observó diferencias en relación a los datos de control se observó cuando el péptido se administró 1 hora después de la exposición a la irradiación.

Estas divulgaciones de la técnica anterior están en marcado contraste con la presente invención; los péptidos anti-radiación, tal como se describen en el presente documento, pueden proporcionar protección incluso si se administran varias horas después de la irradiación de todo el cuerpo.

Los sujetos que han recibido dosis sub-letales de radiación ya se beneficiarán de las propiedades antiinflamatorias de algunos de los pequeños péptidos identificados en el presente documento, pero sorprendentemente el mayor beneficio vendrá de la actividad anti-síndrome gastrointestinal de los péptidos pequeños, en particular de los péptidos 3- y 4-mer a dosis por encima de 1 mg/kg, preferentemente por encima de 5 mg/kg, más preferentemente por encima de 10 mg/kg de peso corporal. Considerando la naturaleza poco inmunogénica de los péptidos pequeños (es decir, los de 3 a 4 aa), será posible una dosificación de hasta 100 mg/kg con péptidos pequeños, y en algunos casos, cuando se determina la necesidad de tratamiento que es agudo teniendo en cuenta la condición del sujeto en necesidad de tratamiento, de hasta 200 mg/kg, 500 mg/kg o incluso 1 g/kg. Por consiguiente, ahora es posible el tratamiento de sujetos que tienen una lesión por radiación que comprende el daño de la mucosa del tracto intestinal de dicho sujeto, el denominado síndrome gastrointestinal; los péptidos permiten que se recupere lentamente el revestimiento epitelial.

Para una mejor actividad de los péptidos a dosis de radiación alta, es preferible seleccionar un péptido para la inclusión en una composición farmacéutica de la presente invención o para su inclusión en un autoinyector, según la presente invención, que tiene un factor de reducción de dosis (DRF) contra irradiación gamma aguda, como mínimo, de 1,10, dicho DRF es determinable mediante pruebas de que dosis de irradiación de todo el cuerpo (WBI) resulta en un 50% de mortalidad a los 30 días (LD50/30) en un grupo de prueba de roedores de experimentación (por ejemplo, ratones) tratados con dicho péptido inmediatamente o hasta 72 horas después de WBI, frente a la dosis de WBI que resulta en un 50% de mortalidad a los 30 días (LD50/30) en un grupo de control no tratado, y en el que el DRP se calcula dividiendo la dosis de radiación LD50/30 de los animales tratados con el péptido entre la dosis de radiación LD50/30 de los animales tratados con vehículo.

Es aún más preferente utilizar un péptido que tiene un factor de reducción de dosis (DRF), como mínimo, de 1,20, más preferentemente, como mínimo, de 1,25, especialmente cuando dicha lesión por radiación es lesión por irradiación. Dichos péptidos, tal como se identifican en el presente documento, también se denominan péptidos anti-radiación. La presente invención da a conocer una composición farmacéutica para el tratamiento de las lesiones por irradiación con independencia de si la radiación es emitida por sustancias radiactivas (radioisótopos), tales como uranio, radón y plutonio, o es producida por fuentes artificiales, tales como rayos X y máquinas de radioterapia.

La presente invención también da a conocer la utilización de un péptido de menos de 30 aminoácidos para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que sufre o se cree que sufre de una lesión por radiación. Tal como se mencionó anteriormente, es preferente que dicho péptido sea menor de 15 aminoácidos, y, para la automedicación o para administración por legos, es incluso más preferente que dicho péptido sea menor de 7 aminoácidos. Varios péptidos 3-mer útiles para utilizar en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de las lesiones por radiación se identifican en el presente documento como VVC, LAG y AQG. En el presente documento se da a conocer la utilización de un péptido seleccionado del grupo que comprende VVC, LAG, AQG, LQGV, QVVC, MTRV, AQGV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, EMFQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG, YAIT, APSL, ITTL, QALG, GVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNH, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPG, LQGA, LCFL, TLAVE, VEGNL, LNEAL, VLPALP, MGGTWA, LTCDDP, VLPAPLQ, VCNRYRDV, CPRGVNP, QPLAPLVG y DINGFLPAL, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que sufre o se cree que sufre de lesión por radiación.

Por lo tanto, péptidos 4-mer útiles para el tratamiento de lesiones por radiación son LQGV, QVVC, MTRV, AQGV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, EMFQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG, YAIT, APSL, ITTL, QALG, GVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNH, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPG, LQGA y LCFL, péptidos 5-mer útiles para el tratamiento de lesiones por radiación son TLAVE, VEGNL y LNEAL, péptidos 6-mer útiles para el tratamiento de lesiones por radiación son VLPALP, MGGTWA, LTCDDP, péptidos 7-mer útiles para el tratamiento de lesiones por radiación son VLPAPLQ, VCNRYRDV y CPRGVNP, un péptido 8-mer útil para el tratamiento de lesiones por radiación es QPLAPLVG y un péptido 9-mer útil para el tratamiento de las lesiones por radiación es DINGFLPAL.

Otros péptidos, especialmente péptidos 3 o 4-mer, se pueden encontrar mediante ensayo de la actividad anti-ciclo celular en ensayos de proliferación, por ejemplo, utilizando el ensayo de crecimiento de plantas, tal como se describe en el presente documento. Es preferente la utilización de un péptido para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que sufre o se cree que sufre de lesiones por radiación, en el que la radiación dicho péptido consta de 2 a 6 aminoácidos. Nuevamente, desde el punto de vista de la prevención de reacciones adversas, tales como choque anafiláctico, por lo tanto, es preferente que la composición farmacéutica se prepare con un péptido que consta de 2 a 6 aminoácidos, más preferentemente que consta de 3 a 5

aminoácidos, y más preferentemente consta de 3 ó 4 aminoácidos. Si sólo desde el punto de vista de la actividad, sobre la base de un conocimiento general de que la actividad es mayor al aumentar el tamaño del péptido, aunque sólo sea para resistir la proteólisis completa (después de la administración) mediante lo cual los fragmentos metabólicos de 3 aa todavía tienen actividad, en este documento es preferente que dicho péptido consista de 4 aminoácidos.

Además, es particularmente útil que los sujetos en necesidad de tratamiento por lesiones por radiación pueden ahora ser tratados a través de una simple inyección subcutánea o intramuscular, permitiendo así que el autotratamiento con un autoinyector o el tratamiento por personal no entrenado o no médico, lo que facilita enormemente la organización de ayuda en situaciones de emergencia, en las que miles de personas pueden necesitar tratamiento. Si sólo se han encontrado que son útiles inyecciones intravenosas o inyecciones intraperitoneales de riesgo similar, sería más difícil de ayudar a los sujetos en necesidad de tratamiento, cuando se compara ahora con la situación de que se proporcionan en el presente documento herramientas simples de administración tales como autoinyectores.

En particular, la presente invención también da a conocer la utilización de un péptido referido a los ácidos anteriores para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de las lesiones por radiación, en el que dicha composición farmacéutica está contenida en un autoinyector. Un autoinyector es un dispositivo médico diseñado para administrar una dosis única de un fármaco en particular (habitualmente de salvamento), a menudo también se describe como una jeringa precargada para autoinyección o inyección por personal no médico o desconocedor de la materia. Tal como se utiliza en el presente, el término "autoinyector" no se refiere a un inyector para la aplicación automatizada de una muestra biológica (por ejemplo, péptido) en un sistema analítico, tal como un aparato de cromatografía, tal como se describe por ejemplo en Husek y otros (J. of Chromatography B: Biomedical Sciences & Applications, Elsevier, Amsterda, Vol. 767, No. 1, (2002) pág.169-174).

Por diseño, los autoinyectores son fáciles de utilizar y están destinados para la autoadministración por los pacientes o la administración por legos a los pacientes. El sitio de inyección es típicamente en el muslo o las nalgas, en el que dicho tratamiento comprende la inyección subcutánea o intramuscular con dicho péptido. Debido a que los autoinyectores pueden ser diseñados para suministrar de forma automática y fiable una dosis deseada de medicamento, facilitan la administración rápida, conveniente y exacta de medicamentos. En particular, los autoinyectores están bien adaptados para su utilización por sujetos que deben autoadministrarse sustancias terapéuticas o para el personal sanitario que deben inyectar numerosos sujetos durante un periodo de tiempo relativamente corto, por ejemplo, en una situación de emergencia. Además, los autoinyectores que incorporan un mecanismo de inyección por aguja pueden estar diseñados de manera que la aguja está oculta a la vista antes, durante e incluso después de una operación de inyección, reduciendo o eliminando así cualquier ansiedad asociada con el acto de penetrar una aguja visible en el tejido del sujeto. Aunque sus especificaciones precisas varían ampliamente, autoinyectores con agujas incluyen generalmente un cuerpo o alojamiento, una jeringa con aguja o dispositivo similar, y uno o más mecanismos de accionamiento para insertar una aguja en el tejido del sujeto y administrar una dosis deseada de medicamento líquido a través de la aguja insertada. Los mecanismos de accionamiento incluidos en los autoinyectores con aguja del estado de la técnica generalmente incluyen una fuente de energía capaz de alimentar el mecanismo de accionamiento. Esta fuente de energía puede ser, por ejemplo, mecánica (es decir, cargada por resorte), neumática, electromecánica, o química, tal como se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 6.149.626, 6.099.504, 5.957.897, 5.695.472, 5.665.071, 5.567.160, 5.527.287, 5.354.286, 5.300.030, 5.102.393, 5.092.843, 4.894.054, 4.678.461 y 3.797.489, las Publicaciones Internacionales números WO 01/17593, WO 98/00188, WO 95/29720, WO 95/31235, y WO 94/13342 describen también varios inyectores que incluyen mecanismos de accionamiento diferentes. La mayoría de los autoinyectores son jeringas (opcionalmente con resortes). Un autoinyector de la presente invención, en particular el cuerpo o alojamiento del mismo que está en contacto directo con el péptido, se hace preferentemente de un material que tiene una afinidad mínima por los péptidos. Esto puede reducir al mínimo la adhesión no deseada o pegado de los péptidos al autoinyector. Un material muy adecuado es el polipropileno, en particular polipropileno esencialmente puro.

Los autoinyectores se diseñaron inicialmente para superar las dudas asociadas a la autoadministración de fármacos basada en aguja. Ejemplos de dichos autoinyectores son Epipen® o el recientemente introducido Twinject®, que a menudo se prescribe a personas que están en riesgo de anafilaxis. Otro ejemplo de un autoinyector es el Rebiject® para el interferón beta utilizado para tratar la esclerosis múltiple. A menudo, los autoinyectores se utilizan en el ejército para proteger al personal de agentes de guerra química. En el Ejército de Estados Unidos, un autoinyector es parte de todo kit de Respuesta a Armas Químicas o Biológicas. Se expide a todos los soldados en el caso de que puedan enfrentar armas biológicas o químicas. La aguja inyecta automáticamente a la persona una vez que se activa, atravesando toda la ropa (incluso varias capas) que uno pueda usar. Un autoinyector en el presente documento no sólo comprende los dispositivos de inyección mencionados anteriormente, que generalmente son accionados por resorte, por lo que la penetración en la piel y/o la inyección del fármaco tiene lugar automáticamente, sino que también comprende jeringas precargadas, o cartuchos autoinyectores y similares.

La presente invención da a conocer un autoinyector útil para el tratamiento de las lesiones por radiación o irradiación con independencia de si la radiación es emitida por sustancias radioactivas (radioisótopos), tales como uranio, radón, y plutonio, o es producida por fuentes artificiales, tales como rayos X y máquinas de radioterapia.

La presente invención también da a conocer un autoinyector que comprende una composición farmacéutica que consiste en un péptido, según la reivindicación 1, (en el presente documento también denominado péptido anti-radiación) y un excipiente adecuado. Los excipientes adecuados son conocidos en la técnica, véase por ejemplo el Manual de formulaciones de fabricación de productos farmacéuticos (editado por Sarfaraz K Niazi; ISBN: 0849317460).

Los excipientes adecuados, por ejemplo, se componen de agua, propilen glicol, alcohol etílico, benzoato de sodio y ácido benzoico como tampones, y alcohol bencílico como conservante; o de manitol, albúmina de suero humano acetato sódico, ácido acético, hidróxido de sodio, y agua para inyección. Otras composiciones de ejemplo para administración parenteral a través de un autoinyector incluyen soluciones o suspensiones inyectables que pueden contener, por ejemplo, diluyentes o disolventes parenteralmente aceptables no tóxicos adecuados, tales como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer, solución de cloruro sódico isotónica, u otros agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos, y ácidos grasos, incluyendo ácido oleico.

Por ejemplo, un autoinyector comprende como ingrediente activo un péptido anti-radiación que es capaz de reducir los efectos adversos de la radiación en un sujeto cuando se administra después de que el sujeto ha sido expuesto a la radiación. Preferentemente, dicho péptido puede conferir, como mínimo, una protección parcial contra el daño por radiación, si se administra, como mínimo, 30 minutos, más preferentemente, como mínimo, una hora, más preferentemente, como mínimo, varias horas o incluso varios días (por ejemplo, 3 días) después de la irradiación. Este tipo de autoinyector también se conoce como "autoinyector de emergencia", lo que refleja su aplicabilidad en situaciones de emergencia inesperadas.

En una realización, la presente invención da a conocer un autoinyector que contiene una solución estéril envasada en un dispositivo de tipo jeringa que administra todo su contenido de 5 mL automáticamente tras la activación. Cada ml contiene 100 mg, preferentemente 200 mg, de péptido anti-radiación junto con un excipiente, tal como un excipiente que comprende propilenglicol, alcohol etílico, benzoato de sodio y ácido benzoico como tampones, y alcohol bencílico como conservante. En una realización preferente, el autoinyector para el tratamiento de las lesiones por radiación porta un péptido anti-radiación menor de 15 aminoácidos, más preferentemente de menos de 7 aminoácidos.

Son preferentes los autoinyectores para el tratamiento de lesiones por radiación aguda que porta un péptido de 3 a 4 aa de longitud, preferentemente un péptido que tiene un factor de reducción de dosis (DRF) contra la irradiación gamma aguda, como mínimo, de 1,10, dicho DRF es determinable mediante pruebas de que dosis de radiación resulta en un 50% de mortalidad a los 30 días (LD50/30) después de la radiación en todo el cuerpo (WBI) en un grupo de prueba de ratones tratados con dicho péptido a las 72 horas después de WBI y, ensayando que dosis de radiación resulta en un 50% de mortalidad a los 30 días (LD50/30) después de la radiación en todo el cuerpo (WBI) en un grupo de control de ratones tratados solamente con el vehículo de dicho péptido a las 72 horas después de WBI y, en el que el DRF se calcula dividiendo la LD50/30 de los animales tratados con el péptido entre la LD50/30 de los animales de control.

Aún más preferente es un autoinyector que porta un péptido que tiene un factor de reducción de dosis (DRF), como mínimo, de 1,20, más preferentemente, como mínimo, de 1,25. Péptidos adecuados para su inclusión en un autoinyector son también los que tienen actividad anti-ciclo celular en plantas, tal como se determina en la presente memoria. Péptidos muy adecuados para su utilización en un autoinyector de la presente invención son VVC, LAG, AQQ, LQGV, QVVC, MTRV, AQQV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG, YAIT, APSL, ITTL, QALG, OVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNH, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPG, LQGA, LCFL, TLAVE, VEGNL o LNEAL.

La presente invención también da a conocer una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que sufre o se cree que sufre de una lesión por radiación, dicha composición farmacéutica comprende: una cantidad farmacológicamente eficaz de péptido anti-radiación, o se describe una composición farmacéutica, tal como se identifica en el presente documento, junto con un diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención se adjunta proporciona un método de tratamiento o prevención de las lesiones por radiación en un sujeto en necesidad del mismo o en necesidad potencial de los mismos, comprendiendo dicho procedimiento: administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende: medios para tratar o prevenir las lesiones por radiación, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que dichos medios comprenden un péptido anti-radiación o composición farmacéutica tal como aquí identificado, en particular en donde dicha lesión por radiación comprende lesiones por irradiación. Dicho péptido se puede obtener o derivar del péptido MTRVLQGVLPALPQVVC o del péptido LPGCPRGVNPVVS. Es preferente que el oligopéptido se seleccione del grupo que comprende MTR, MTRV, LQG, LQGV, VLPALP, VLPALPQ, QVVC, VVC, AQQ, AQQV, LAG, LAGV y cualquier combinación de los mismos. Es preferente que el oligopéptido se seleccione del grupo que comprende LPGC, CPRGVNP y PGCP. Dichos oligopéptidos son particularmente útiles cuando dicha lesión por radiación comprende lesiones por irradiación. La presente invención también da a conocer una composición farmacéutica para el tratamiento de las

lesiones por radiación que comprende un oligopéptido que se puede obtener o derivar del péptido MTRVLQGVLPALPQVVC o del péptido LPGCPRGVNPVVS, tal como un oligopéptido que se selecciona del grupo que comprende MTR, MTRV, LQG, LQGV, VLPALP, VLPALPQ, QVVC, VVC, AQG, AQGV, LAG, LAGV, LPGC, CPRGVNP y PGCP, y combinaciones de cualquiera de los mismos y la utilización de dicho oligopéptido o oligopéptidos para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de las lesiones por radiación.

Anteriormente se informó la inhibición del shock séptico en ratones por un oligopéptido 6-mer (VLPALP) derivado de la cadena beta de la hormona gonadotropina coriónica humana. Además, se demostró que otros péptidos cortos diferentes (de péptidos triméricos en adelante) derivados del bucle 2 de la cadena beta de hCG (residuos 41-57), y modificaciones de algunos de dichos péptidos obtenidos por la sustitución por alanina de aminoácidos individuales, tienen similar actividad antiinflamatoria. Además, se da a conocer un razonamiento para la selección de varios de ellos para continuar el desarrollo hacia un compuesto terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias agudas después de una exposición accidental a radiación ionizante.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glicoproteínica heterodimérica placentaria requerido en el embarazo. En la orina del embarazo humano y en preparados comerciales de hCG se produce en una variedad de formas, incluyendo productos de degradación. Varios investigadores han estudiado los efectos de la hCG heterodimérica y sus variantes sobre el sistema inmune debido a su supuesto papel en la prevención del rechazo del aloinjerto fetal durante el embarazo. Varios informes han sugerido la modulación del sistema inmune por la hormona intacta, pero dichos efectos de los productos de degradación no se han dado a conocer. Anteriormente (Khan y otros, Hum. Immunol. 2002 Ene; 63 (1): 1-7), se informó de la inhibición del shock séptico en ratones por un oligopéptido 6-mer (VLPALP) derivado de la cadena beta de la hormona gonadotropina coriónica humana. Un único tratamiento con este hexapéptido después de inyección de lipopolisacárido (LPS) en dosis elevadas inhibió el choque séptico en ratones. Benner y Khan (Scand. J. Immunol. Jul 2005; 62 Supl 1:62-6) estudiaron la actividad inmunológica posible en fragmentos de péptidos liberados *in vivo* procedentes de partes de la secuencia MTRVLQGVLPALPQVVC (residuos 41-57) del bucle 2 de la subunidad beta de hCG. En el presente documento, se informa de que varios péptidos de 3 a 7 aminoácidos de longitud tomados del bucle 2 de la subunidad beta - y péptidos con reemplazo de alanina derivados de algunos - muestran significativa actividad antiinflamatoria, medida por la inhibición del síndrome de shock séptico en ratones y están más allá de que se consideren útiles para el tratamiento de las lesiones por radiación, en particular de lesión por radiación que comprende el síndrome gastrointestinal y para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de las lesiones por radiación, en particular de lesión por radiación que comprende el síndrome gastrointestinal.

Leyendas

Figura 1. Irradiación de Todo el Cuerpo de ratones tratados con AQGV (péptido EA-230).

"WBI" se refiere a Irradiación de Todo el Cuerpo. La protección contra daños por radiación *in vivo* se evaluó después de WBI (6,5 a 9,8 Gy, Philips MG 30 a 81 cGy/min) en ratones C57B1/6 anestesiados, y las diferencias de supervivencia se midieron por análisis Kaplan-Meier. Todos los grupos de ratones recibieron la primera inyección con péptidos o vehículo (animales de control) 3 horas después del WBI. El grupo que recibió una inyección de placebo experimentó una mortalidad de un 80%, según lo previsto en este modelo. La dosis de radiación de 8,6 Gray (Gy = 8,6) es conocido que, en esta especie, causa de una mortalidad del 80%, por lo que se denomina LD80 (dosis letal para el 80%). Las muertes comenzaron en torno al Día 10 - lo cual es típico de lo que ocurre en WBI en animales o seres humanos: En torno al Día 10, el revestimiento del intestino está tan dañado y agujereado por la radiación que las bacterias penetran en la circulación y causan el síndrome gastrointestinal, y la médula ósea está tan dañado que no hay suficientes glóbulos blancos para combatir la infección ("Síndrome de médula ósea"), y se produce la muerte. Al grupo con "x" como símbolo se le administró la primera inyección IV, y la segunda inyección por vía subcutánea (SC) 3 horas después de la primera inyección. El 100% de estos animales sobrevivieron. Lo que el gráfico no muestra es que no presentaron ningún signo de enfermedad en absoluto. Para un observador externo, se verían como ratones perfectamente normales. Al grupo con el símbolo de triángulo se le administró su primera inyección del péptido por vía SC. A continuación, se le administraron inyecciones adicionales SC cada 48 horas, para un total de 3 dosis (además de la primera dosis) - es decir, en el Día 3, Día 5 y el Día 7. Cabe señalar que sólo uno de estos animales murió. El grupo con el símbolo cuadrado fue idéntico en los procedimientos al grupo con el símbolo de triángulo, con la excepción de que las inyecciones SC cada 48 horas continuaron hasta que se hubieron inyectado un total de 6 dosis (además de la primera dosis). Así, la dosificación continuó hasta el Día 13. Cabe señalar que esta prolongación del tratamiento se asoció con una protección completa (sin mortalidad alguna en este grupo). Los animales en este grupo no mostraron signos de enfermedad. Lo que se puede concluir de estos datos es que cuando los animales recibieron dos dosis de péptido en el primer día (siendo la primera IV), hubo una protección completa contra una dosis altamente letal de WBI. Cuando los animales recibieron un tratamiento con dosis más bajas (sólo SC), si el tratamiento se prolongó hasta la segunda semana, una vez más hubo una protección completa.

Figura 2 Segundo conjunto de experimentos de radioprotección con el péptido AQGV

Las dosis crecientes de irradiación de todo el cuerpo (WBI), con una exposición única administrada a cualquier grupo en particular, y la dosis de exposición aumentando progresivamente, para cada grupo posterior. Una sola

dosis de péptido EA-230 (AQGV) se administró por vía subcutánea, pero con tratamiento retrasado hasta tres días (72 horas) después de la WBI. La prueba se llama factor de reducción de dosis ("DRF"), que se define como la relación entre la LD50 del grupo tratado con respecto a la LD50 del grupo de control. La LD50 se refiere a la dosis que es letal para el 50% de los animales ensayados. Un valor aceptable DRF es 1,20. Para pasar la prueba, en el

Figura 3 Un ejemplo del efecto de oligopéptidos en el análisis del ciclo celular de *Arabidopsis thaliana*. Los compuestos NAK 4 (LQGV) y NAK 9 (WC) muestran un claro efecto sobre los marcadores analizados. Para el marcador del ciclo celular (pCDG), se observó un claro efecto, para ambos puntos de tiempo, en las raíces. En la zona de transición y los cotiledones se observó el efecto de una manera dependiente del tiempo y/o de la dosis. En el caso del marcador de respuesta de auxina (DR5::GUS) se observó lo mismo que con el marcador del ciclo celular. NAK 26 (DINGFLPAL) muestra un efecto menos consistente y dependiente del tiempo. Se observó un efecto solamente en el tiempo en las raíces. No se observó efecto en la zona de transición y los cotiledones.

Figura 4. Un ensayo en oligopéptidos representativos para su efecto sobre la proliferación durante el crecimiento rápido de monocitos murinos inducidos por CD3 cuando ocurre división celular. Los ratones (n = 5) fueron tratados ip PBS, Nak4 (LQGV), Nak47 (LAGV), Nak46 (AQGV) proporcionados por Ansynth BV, Países Bajos, o Nak46* (AQGV proporcionado por Diosynth BV, Países Bajos). Los ratones fueron tratados con 0,5 mg/kg de péptido 5 mg/kg durante una hora después de lo cual se aislaron los bazo y se prepararon suspensiones de células de bazo. Las suspensiones de células de bazo se agruparon por grupo y se cultivaron *in vitro* (en tres veces) en presencia de PBS o de anticuerpo anti-CD3 y se evaluó la proliferación a las 0, 12, 24 y 48 horas después del cultivo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se utiliza en el presente documento, un péptido "purificado, sintético o aislado" es aquel que ha sido purificado de una fuente natural o biotecnológica o, más preferentemente, es sintetizado tal como se describe en el presente documento.

"Composición", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a compuestos químicos que contienen o consisten en el oligopéptido. El oligopéptido se aísla preferentemente antes de la inclusión en la composición. El oligopéptido preferentemente consta de dos (2) a seis (6) aminoácidos, más preferentemente de tres (3) a cuatro (4) aminoácidos.

Por ejemplo, un compuesto preferente, en una realización, podría ser: NT A Q G V CT en el que NT en el extremo N se selecciona entre el grupo H-, CH₃-, un grupo acilo, o un grupo protector general; y CT en el extremo C se selecciona del grupo de los péptidos pequeños (por ejemplo, de 1 a 5 aminoácidos), -OH, -OR¹, -NH₂, -NHR¹, -NR¹R², o -N(CH₂)₁₋₆, NR¹R², en el que R¹ y R², cuando están presentes, se seleccionan independientemente entre H, alquilo, arilo, (ar)alquilo, y en el que R¹ y R² pueden estar unidos cíclicamente el uno al otro.

"Alquilo", tal como se utiliza en el presente documento, es preferentemente un hidrocarburo saturado ramificado o no ramificado que tiene de uno a seis átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, e isopentilo.

"Arilo", tal como se utiliza en el presente documento, es un grupo hidrocarburo aromático, que tiene preferentemente de 6 a 10 átomos de carbono, tal como fenilo o naftilo.

"(Ar)alquilo", tal como se utiliza en el presente documento, es un grupo areno (que tiene tanto partes alifáticas como aromáticas), preferentemente que tiene de 7 a 13 átomos de carbono, tales como bencilo, etilbencilo, n-propilbencilo e isobutilbencilo.

"Oligopéptido", tal como se usa en el presente documento, son péptidos que tienen de 2 a 12 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Equivalente a oligopéptidos son compuestos que tienen las mismas cadenas laterales o equivalentes a los aminoácidos particulares utilizados en un oligopéptido y dispuestas secuencialmente en el mismo orden que los péptidos, pero unidas entre sí por enlaces no peptídicos, por ejemplo, mediante enlaces isostéricos tales como ceto isótero, hidroxí isótero, diceto isótero, o ceto-difluorometileno isótero.

"Composición" también incluye, por ejemplo, una sal aceptable del oligopéptido o un oligopéptido marcado. Tal como se utiliza en el presente documento, "sal aceptable" se refiere a sales que conservan la actividad deseada del oligopéptido o compuesto equivalente, pero preferentemente no afectan negativamente la actividad del oligopéptido u otra componente de un sistema en el que se utiliza el oligopéptido. Ejemplos de dichas sales son sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, y similares. Las sales también se pueden formar con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pámico, ácido algínico, ácido

poliglutámico, y similares. Se pueden formar sales con cationes metálicos polivalentes tales como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel y similares o con un catión orgánico formado a partir de N, N'-dibenciletilendiamina o etilendiamina, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, una sal de tanato de zinc).

5 Dicha composición farmacéutica puede administrarse al sujeto por vía oral o parenteral. Dicha composición farmacéutica puede consistir esencialmente en oligopéptido y PBS. Se prefiere que el oligopéptido sea de origen sintético. El tratamiento adecuado, por ejemplo, implica la administración del oligopéptido en la composición farmacéutica al paciente por vía intravenosa en una cantidad desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 35 mg/kg de masa corporal del sujeto. Puede ser útil que la composición farmacéutica consista esencialmente de uno a

10 tres oligopéptidos diferentes.

La entidad química así desarrollada puede ser administrada e introducida *in vivo* de forma sistémica, tópica o local. El péptido, o su modificación, se puede administrar como la entidad como tal o como un ácido o sal de adición de base farmacéuticamente aceptable, formada por la reacción con un ácido inorgánico (tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiocianico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico); o con un ácido orgánico (tal como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico); o por la reacción con una base inorgánica (tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio), o con una base orgánica (tales como mono-, di-, trialkil y aril aminas y etanolaminas sustituidas). Un péptido seleccionado y cualquiera de las entidades derivadas pueden también conjugarse con azúcares, lípidos, otros polipéptidos, ácidos nucleicos y PNA; y funciona in-situ como un conjugado o se libera localmente después de alcanzar un tejido o un órgano objetivo.

25 Una "sustitución" con respecto a los distintos aminoácidos se refiere en general a la sustitución de un grupo tal como alcoxi, halógeno, hidroxilo, nitro, alquilo inferior o en un anillo aromático por hidrógeno, que normalmente estaría presente. Las sustituciones también se pueden hacer en la cadena de alquilo que conecta la porción aromática de la cadena principal del péptido, por ejemplo, con grupos alquilo inferiores que sustituyen al hidrógeno. Aún se pueden hacer más sustituciones en la posición alfa de un aminoácido, también utilizando un grupo alquilo.

30 Las sustituciones preferentes implican la utilización de flúor o cloro como halógeno, y metoxi como grupo alcoxi. Con respecto al alquilo y al alquilo inferior, generalmente los grupos alquilo que tienen menos átomos de carbono (1 a 3) son preferentes.

35 Los compuestos según la fórmula general se pueden preparar de una manera convencional para dicho compuestos. Para ello, análogos de aminoácidos o péptidos N alfa protegidos adecuados (y cadena lateral protegida si están presentes cadenas laterales reactivas) se activan y se a aminoácido carboxilo protegidos adecuados o péptidos derivados ya sea en solución o sobre un soporte sólido. La protección de las funciones alfa-amino generalmente tiene lugar mediante las funciones uretano, tales como el grupo terciario-butiloxycarbonilo lábil a ácidos ("Boc"), grupo benziloxycarbonilo ("Z") y análogos sustituidos del grupo 9-fluorenyl-metiloxycarbonilo lábil a bases ("Fmoc"). El grupo Z también se puede eliminar por hidrogenación catalítica. Otros grupos protectores adecuados incluyen el

40 Nps, Bmv, Bpoc, Alloc, MSC, etc. Una buena visión general de los grupos protectores amino se proporciona en Los Péptidos, Análisis, Síntesis, Biología, Vol.3, E. Gross y J. Meienhofer, eds. (Academic Press, Nueva York, 1981). La protección de los grupos carboxilo puede tener lugar por la formación de éster, por ejemplo, ésteres lábiles a bases, tales como metilo o etilo, ésteres lábiles a ácido tal como tertbutilo o ésteres benzilo sustituidos o hidrogenolíticamente. La protección de las funciones de la cadena lateral como las de lisina y ácido glutámico o aspártico puede tener lugar utilizando los grupos mencionados anteriormente. La protección de tiol, y aunque no es siempre se requiere, de guanidino, alcohol y grupos imidazol puede tener lugar usando una serie de reactivos tales como los descritos en Los Péptidos, Análisis, Síntesis, Biología, id. o en Química Pura y Aplicada, 59 (3), 331-344 (1987). La activación del grupo carboxilo de aminoácidos o péptidos protegidos adecuadamente puede tener lugar mediante el método de azida, anhídrido mixto, éster activo, o carbodiimida, especialmente con la adición de

50 compuestos catalíticos y de supresión de la racemización tal como 1-N-N-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinimida, 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazina, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxiimida. También se pueden utilizar anhídridos de ácidos basados en fósforo. Véase, por ejemplo, Los Péptidos, Análisis, Síntesis, Biología, supra y Química Pura y Aplicada, 59 (3), 331-344 (1987).

55 También es posible preparar los compuestos mediante el método en fase sólida de Merrifield. Diferentes soportes sólidos y diferentes estrategias son conocidas véase, por ejemplo Barany y Merrifield en Los Péptidos, Análisis, Síntesis, Biología, Vol.2, E. Gross y J. Meienhofer, eds. (Acad. Press, Nueva York, 1980); Kneib-Cordonier y Mullen, Int. J. Peptide Protein Res., 30, 705-739 (1987); Y Fields y Noble, Int. J. Peptide Protein Res., 35, 161-214 (1990). La síntesis de compuestos en los que un enlace peptídico está reemplazado por un isómero, en general, puede ser realizada utilizando los grupos protectores y procedimientos de activación descritos anteriormente. Los procedimientos para sintetizar los isómeros modificados están descritos en la literatura, por ejemplo, para el isómero -CH₂-NH- y para el isómero -CO-CH₂.

65 La eliminación de los grupos protectores, y, en el caso de la síntesis de péptidos en fase sólida, la escisión del soporte sólido, puede tener lugar de diferentes maneras, dependiendo de la naturaleza de los grupos protectores y del tipo de enlazador al soporte sólido. Por lo general, la desprotección se lleva a cabo bajo condiciones ácidas y en

presencia de secuestadores. Véase, por ejemplo, volúmenes 3, 5 y 9 de la serie Los péptidos, Análisis, Síntesis, Biología, supra.

5 Otra posibilidad es la aplicación de enzimas en la síntesis de dichos compuestos; para revisiones véase, por ejemplo, HD Jakubke en Los Péptidos, Análisis, Síntesis, Biología, vol. 9, S. Udenfriend y J. Meienhofer, eds. (Acad. Press. Nueva York, 1987).

10 Aunque posiblemente no es deseable desde el punto de vista económico, los oligopéptidos según la presente invención también se podría preparar de acuerdo con métodos de ADN recombinante. Dichos métodos implican la preparación del oligopéptido deseado del mismo mediante la expresión de la secuencia del polinucleótido recombinante que codifica para uno o más de los oligopéptidos en cuestión en un microorganismo adecuado como huésped. Generalmente, el proceso implica la introducción en un vehículo de clonación (por ejemplo, un plásmido, ADN de fago, u otra secuencia de ADN capaz de replicarse en una célula huésped) una secuencia de ADN que codifica para el oligopéptido u oligopéptidos en particular, la introducción del vehículo de clonación en una célula huésped eucariota o procariota adecuada, y cultivar la célula huésped transformada de esta manera. Cuando se utiliza una célula hosped eucariota, el compuesto puede incluir una parte de glicoproteína.

20 La funcionalidad de un péptido puede ser determinada utilizando un ensayo *in vivo* y/o *in vitro*. El ensayo *in vitro* es preferente. En una realización, un análogo de péptido funcional se somete a ensayos comparativos utilizando una referencia o péptido de control, por ejemplo un análogo de péptido que consiste únicamente en L-aminoácidos. Un ensayo adecuado comprende la determinación de la capacidad del péptido candidato para afectar la dinámica del ciclo celular. Por ejemplo, el efecto sobre la progresión del ciclo celular se puede determinar utilizando un sistema modelo de plantas, por ejemplo, el sistema de *Arabidopsis* ejemplificado en el presente documento más adelante, o utilizando células (de mamífero) cultivadas. En un aspecto adicional, esto implica la determinación de la capacidad del péptido candidato para inhibir la apoptosis, por ejemplo, mediante la inducción de la detención del ciclo celular G2-M (temporal).

30 En una realización de la presente invención, un péptido anti-radiación comprende una secuencia de aminoácidos unida en una cadena mediante enlaces peptídicos entre sus grupos amino y carboxilatos, en el que, como mínimo, un aminoácido es un D-aminoácido. Por ejemplo, el péptido anti-radiación se selecciona del grupo que comprende VVC, LAG, AQG, LQGV, VVC, MTRV, AQGV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, EMFQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG, YAIT, APSL, ITTL, QALG, GVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNL, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPG, LQGA, LCFL, TLAVE, VEGNL, LNEAL, VLPALP, MGGTWA, LTCDDP, VLPAPLQ, VCNYRDV, CPRGVNP, QPLAPLVG y DINGFLPAL, en el que, como mínimo, uno de los restos de aminoácidos indicados por el código estándar de una letra es un D-aminoácido.

40 El término "composición farmacéutica", tal como se utiliza en el presente documento, pretende cubrir tanto la composición activa de la presente invención sola o una composición que contiene la composición de la presente invención junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por supuesto, una composición farmacéutica puede comprender una mezcla, como mínimo, de dos péptidos anti-radiación, tal como se describe en el presente documento. Diluyentes aceptables de un oligopéptido, tal como se describe en el presente documento en la descripción detallada, por ejemplo, son soluciones salinas fisiológicas o soluciones salinas tamponadas de fosfato. En una realización, un oligopéptido o composición se administra en una concentración eficaz a un animal o humano de forma sistémica, por ejemplo, por administración intravenosa, intramuscular o intraperitoneal. Otra forma de administración comprende la perfusión de órganos o tejido, ya sea *in vivo* o *ex vivo*, con un fluido de perfusión que comprende un oligopéptido o composición, según la presente invención. La administración puede llevarse a cabo en una dosis única, como una secuencia discontinua de varias dosis, o de manera continua durante un período de tiempo suficiente para permitir la modulación sustancial de la expresión génica. En el caso de una administración continua, la duración de la administración puede variar dependiendo de un número de factores que fácilmente será evidente para los expertos en la materia.

50 La dosis de administración de una molécula activa puede variar en un intervalo bastante amplio. Las concentraciones de una molécula activa que pueden ser administradas son habitualmente limitadas por la eficacia en el extremo inferior y la solubilidad del compuesto en el extremo superior. La dosis óptima o dosis para un paciente en particular debería y puede ser determinada por el médico o especialista médico involucrado, teniendo en cuenta factores relevantes bien conocidos, tales como la condición, peso y edad del paciente, etc.

60 La molécula activa puede ser administrada directamente en un vehículo adecuado, tal como, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato ("PBS") o soluciones en alcohol o DMSO. De conformidad con las realizaciones preferentes de la presente invención, sin embargo, la molécula activa es administrada a través de una administración de dosis única utilizando un sistema de administración de fármacos. Un sistema de administración de fármacos adecuado sería farmacológicamente inactivo o, como mínimo, tolerable. Preferentemente, no debería ser inmunogénico ni causar reacciones inflamatorias, y debe permitir la liberación de la molécula activa con el fin de mantener los niveles eficaces de los mismos durante el periodo de tiempo deseado. Son conocidas alternativas en la técnica como adecuados para los propósitos de la liberación sostenida y se contemplan dentro del alcance de la presente invención. Vehículos de administración adecuados incluyen, sin constituir limitación, los siguientes:

microcápsulas o microesferas; liposomas y otros sistemas de liberación basados en lípidos; instilados viscosos; barreras e implantes mecánicos absorbibles y/o biodegradables, y materiales de administración poliméricos, tales como copolímeros de bloque de óxido de polietileno / óxido de polipropileno, poliésteres, alcoholes polivinílicos reticulados, polianhídridos, hidrogeles de polimetacrilato y polimetacrilamida, polímeros de carbohidratos aniónicos, etc. Sistemas de administración útiles son muy conocidos en la técnica.

Una formulación para lograr la liberación de molécula activa comprende microcápsulas o microesferas inyectables hechas de un polímero biodegradable, tal como poli (di-láctido), poli (di-láctido-co-glicólido), policaprolactona, poliglicólido, ácido poliláctico-co-glicólido, poli (ácido hidroxibutírico), poliésteres o poliacetales. Los sistemas inyectables que comprenden microcápsulas o microesferas que tienen un diámetro aproximadamente de 50 a aproximadamente 500 micrómetros a menudo ofrecen ventajas sobre otros sistemas de administración. Por ejemplo, generalmente utilizan menos moléculas activas y pueden ser administradas por personal paramédico. Además, dichos sistemas son intrínsecamente flexibles en el diseño de la duración y la tasa de liberación del fármaco por separado mediante la selección del tamaño de la microcápsula o microesfera, la carga de fármaco y la dosis administrada. Además, pueden ser exitosamente esterilizados por irradiación gamma.

El diseño, preparación y utilización de microcápsulas y microesferas están dentro del alcance de las personas expertas en la materia e información detallada sobre estos puntos está disponible en la literatura. Los polímeros biodegradables (tales como polímeros láctidos, glicólidos y de caprolactona) también pueden ser utilizados en otras formulaciones distintas de microcápsulas y microesferas; por ejemplo, películas preparadas previamente y películas pulverizadas de estos polímeros que contienen la molécula activa serían adecuados para su utilización, según la presente invención. Las fibras o filamentos que comprenden la molécula activa también se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

Otra formulación muy adecuada para una administración de dosis única de la molécula activa, según la presente invención, involucra liposomas. La encapsulación de una molécula activa en liposomas o vesículas multilamelares es una técnica muy conocida para la administración dirigida de medicamentos y residencia del fármaco prolongada. La preparación y utilización de liposomas cargados de fármaco está bien dentro del alcance de las personas expertas en la técnica y están bien documentados en la literatura.

Sin embargo, otro enfoque adecuado para la administración de dosis única de una molécula activa, según la presente invención, implica la utilización de instilados viscosos. En esta técnica, portadores de alto peso molecular se utilizan en mezcla con la molécula o moléculas activas, dando lugar a una estructura que produce una solución con una elevada viscosidad. Como excipientes de alto peso molecular adecuados se incluyen, sin constituir limitación, los siguientes: dextranos y ciclodextranos; hidrogeles; materiales viscosos (reticulados), incluyendo viscoelásticos (reticulados); carboximetilcelulosa; ácido hialurónico y sulfato de condroitina. La preparación y utilización de instilados viscosos cargados con el fármaco es bien conocida para las personas expertas en la materia.

De conformidad con otro enfoque, la molécula o moléculas activas se pueden administrar en combinación con barreras mecánicas absorbibles tales como celulosa oxidada regenerada. La molécula activa puede estar unida de forma covalente o no covalente (por ejemplo, iónicamente) a dicha barrera, o puede simplemente estar dispersa en la misma.

La presente invención se explica adicionalmente con la ayuda de los siguientes ejemplos ilustrativos.

EJEMPLOS

Selección de péptidos.

La selección se basó en los sitios de escisión preferenciales conocidos de la secuencia MTRVLQGVLPALPQVVC (residuos 41-57) del bucle 2 de la subunidad beta de la hCG (Cole y otros, J. Clin. Endocr. Metab. 1993; 76:704-710; H. Alfthan, UH Stenman, Mol. Cell. Endocrinol. 1996; 125:107-120; A. Kardana y otros, Endocrinology, 1991; 129:1541-1550; Cole y otros, Endocrinology, 1991; 129:1559-1567; S. Birken, Y. Maydelman, MA Gawinowicz, Methods 2000; 21:3-14), y en las secuencias de aa tomadas de la proteína C reactiva (CRP) (Beta-catenina, por ejemplo, CTNB humana), tirosina quinasa de Bruton (por ejemplo, BTK humana), metaloproteinasa de la matriz-2 y p-53.

Síntesis de péptidos

Los péptidos mencionados en el presente documento se preparan comercialmente mediante un proceso patentado (Diosynth BV) o mediante síntesis en fase sólida (Ansynth BV) utilizando la metodología basada en fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc)/terc-butilo con resina cloruro de 2-clorotritilo como soporte sólido. La cadena lateral de glutamina se protegió con una función tritilo. Los péptidos se sintetizaron manualmente. Cada acoplamiento consistió en las siguientes etapas: (i) eliminación de la protección alfa-amino-Fmoc por piperidina en dimetilformamida (DMF), (ii) acoplamiento del aminoácido Fmoc (3 eq) con diisopropilcarbodiimida (DIC)/1-

hidroxibenzotriazol (HOBt) en DMF/N-metilformamida (NMP) y (iii) limitación de las funciones amino restantes con anhídrido acético/diisopropiletilamina (DIEA) en DMF/NMP. Tras la finalización de la síntesis, la resina peptídica se trató con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA)/H₂O/triisopropilsilano (TIS) 95:2,5:2,5. Después de 30 minutos, se añadió TIS hasta la decoloración. La solución se evaporó al vacío y el péptido se precipitó con éter dietílico. Los péptidos en bruto se disolvieron en agua (50-100 mg/ml) y se purificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento fase inversa (RP-HPLC). Las condiciones de HPLC fueron: columna: Vydac TP21810C18 (10 x 250 mm); sistema de elución: sistema de gradiente de TFA al 0,1% en agua v/v (A) y 0,1% de TFA en acetonitrilo (ACN) v/v (B); velocidad de flujo 6 ml/minuto; absorbancia se detectó desde 190 hasta 370 nm. Se utilizaron diferentes sistemas de gradiente. Por ejemplo para los péptidos LQG y LQGV: 10 minutos 100% A seguido de gradiente lineal 0-10% de B en 50 minutos. Por ejemplo para los péptidos VLPALP y VLPALPQ: 5 minutos 5% de B seguido por gradiente lineal de 1% de B/minuto. Las fracciones recogidas se concentraron hasta aproximadamente 5 ml mediante evaporación de película rotativa bajo presión reducida a 40°C. El resto de TFA se intercambió mediante elución contra acetato dos veces sobre una columna con resina de intercambio aniónico (Merck II) en forma de acetato. El eluido se concentró y se liofilizó en 28 horas. Los péptidos después se prepararon para su uso mediante su disolución en PBS.

Ejemplo 1 y Ejemplo 2

En el primer experimento, ratones BALB/c hembras de 12 semanas de edad, fueron tratados por vía intraperitoneal con una única inyección de PBS (n=9) o con un péptido (LGQV, VLPALP, LPGCPRGVNPVVS, MTRVLQGVLPALPQVVC, n=8, 10 mg/kg). Una hora y media después del tratamiento los ratones fueron expuestos todo el cuerpo a una dosis única de 10 Gy ¹³⁷Cs-γ-irradiación. En el segundo experimento ratones BALB/c hembras de 12 semanas de edad, fueron primero expuestos todo el cuerpo a una dosis única de 10 Gy ¹³⁷Cs-γ-irradiación y, a continuación 1,5 horas después de la irradiación por vía intraperitoneal con una inyección única de PBS (n= 9) o con un péptido (n= 8 ó 9, 10 mg/kg). Durante el experimento se observó mortalidad y signos clínicos (por ejemplo, ojos llorosos que indican la conjuntivitis y la pérdida de peso) en puntos de tiempo diferentes. Tal como se puede observar en la tabla 2, todos los péptidos ensayados tuvieron buen efecto sobre la reducción de la conjuntivitis en los ratones tratados, sin embargo, no se observaron efectos sobre la mortalidad, que conlleva a seleccionar un péptido más adecuado para combatir la inflamación aguda para ensayar en una fase posterior con dosis repetidas y baja irradiación.

Tabla 1 Efectos del tratamiento intraperitoneal con el péptido (10 mg/kg) en ratones Balb/c hembras de 12 semanas 1,5 horas después de la exposición de todo el cuerpo a irradiación γ (10 Gy).

<u>Mortalidad</u>	<u>Días después de la irradiación</u>					
	0	3	4	5	6	7
PBS	0/9	0/9	0/9	0/9	5/9	9/9
LQGV	0/8	0/8	0/8	0/8	7/8	8/8
VLPALP	0/8	0/8	0/8	0/8	7/8	8/8
LPGCPRGVNPWS	0/8	0/8	0/8	0/8	4/8	8/8
MTRVLQGVLPALPQVVC	0/8	0/8	0/8	0/8	7/8	8/8

<u>Ojos llorosos</u>	<u>Días después de la irradiación</u>		<u>Pérdida de peso</u>	<u>Días después de la irradiación</u>	
	0	4		0	4
PBS	0/9	0/9		0/9	9/9
LQGV	0/8	0/8		0/8	8/8
VLPALP	0/8	0/8		0/8	8/8
LPGCPRGVNPWS	0/8	1/8		0/8	8/8
MTRVLQGVLPALPQVVC	0/8	1/8		0/8	1/8

Tabla 2 Efectos del tratamiento intraperitoneal con el péptido (10 mg/kg) en ratones Balb/c hembras de 12 semanas 1,5 horas después de la exposición de todo el cuerpo a irradiación γ (10 Gy).

Mortalidad	Días después de la irradiación					
	0	3	4	5	6	7
PBS	0/9	0/9	0/9	0/9	6/9	9/9
LQGV	0/9	0/9	0/9	1/9	6/9	9/9
VLPALP	0/9	0/9	0/9	0/9	3/9	9/9
LPGCPRGVNPWS	0/8	0/8	0/8	0/8	6/8	8/8
MTRVLQGVLPALPQVVC	0/9	0/9	0/9	0/9	5/9	9/9

Ojos llorosos	Días después de la irradiación		Pérdida de peso	Días después de la irradiación	
	0	4		0	4
PBS	0/9	6/9		0/9	9/9
LQGV	0/9	3/9		0/9	9/9
VLPALP	0/9	0/9		0/9	9/9
LPGCPRGVNPWS	0/8	0/8		0/8	8/8
MTRVLQGVLPALPQVVC	0/9	0/9		0/9	9/9

Ejemplo 3

Se ensayaron seis oligopéptidos (es decir, A: LAGV, B: AQGV, C: LAG, D: AQG, E: MTR, y F: MTRV) y se compararon con PBS (control) en un estudio en animales a doble ciego para cada capacidad relativa del péptido para ayudar a la recuperación en un ensayo de reperusión isquémica renal en ratón. En este ensayo, los ratones fueron anestesiados, y se extirpó un riñón de cada ratón. El otro riñón se ligó durante 25 minutos, y se dejó aumentar los niveles de urea séricos. Tanto antes como después de la ligadura, se administró cada uno de los péptidos por separado a treinta (30) ratones diferentes (5 mg de oligopéptido/kg de masa corporal por vía intravenosa), después de lo cual, se determinó la mortalidad de los ratones para cada oligopéptido, así como la concentración BUN a las dos horas, 24 horas y 72 horas. Los resultados se muestran en la tabla 3 a continuación (excluyendo los resultados del péptido A (LAGV (SEQ ID NO: 4)) obtenido en el ejemplo 3).

Bajo inhalación de anestesia, se extirpó el riñón izquierdo con su arteria y vena y se ocluyó durante 25 minutos utilizando una pinza microvascular. Durante la cirugía, los animales fueron colocados en una vía de calentamiento para mantener la temperatura corporal a 37°C. Cinco minutos antes de colocar la pinza, y 5 minutos antes de liberar la pinza, se administró por vía intravenosa 5 mg/kg de péptido, disuelto en 0,1 ml de solución salina estéril. Después de la reperusión del riñón izquierdo, se extirpó el riñón derecho. La función del riñón se evaluó midiendo nitrógeno urea en la sangre antes del pizado, y a las 2, 24, y 72 horas después de la reperusión.

Resultados - Tabla 3 (mortalidad a las 72 horas después de la reperusión).

PBS	A (LAGV)	B (AQGV)	C (LAG)	D (AQG)	E (MTR)	F (MTRV)
6/10	6/10	0/10	4/10	4/10	4/10	2/10
*P<(vs PBS)	NS	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
*2X2 prueba chi cuadrado. gl=1						

El péptido A (SEQ ID NO: 4) fue el primer péptido administrado en el ensayo de reperusión de isquemia renal. El personal que llevó a cabo los experimentos pasó por una curva de aprendizaje mientras trabajaba con el péptido A. Durante la administración del péptido en la vena cava inferior, algunos animales experimentaron pérdida moderada de sangre en el sitio de la inyección, mientras que otros no lo hicieron. De forma inadvertida, los animales fueron devueltos a la cuadra sin beber agua, presente en sus jaulas la primera noche después de la cirugía. Además, por error, los animales que estaban destinados a ser sacrificados a las 72 horas murieron 48 horas después de la reperusión. Ninguno de estos u otros problemas se encontraron durante los experimentos con los péptidos B-F.

Tal como se puede observar, los ratones a los que se les administró los oligopéptidos MTRV y especialmente AQGV lo hicieron mucho mejor en términos de supervivencia (una reducción significativa de la mortalidad en comparación con el grupo de control PBS) y la concentración de BUN reducida con respecto al grupo de control (PBS) o el grupo al que se le administraron los otros oligopéptidos, con más ratones supervivientes y siendo mucho menores los niveles séricos de urea que en los otros grupos. Sin embargo, los oligopéptidos LAG, AQG, y MTR, que no tienen efecto en este experimento sobre la reducción de la concentración de BUN, cada uno causó una reducción significativa de la mortalidad en comparación con el control de PBS, donde MTR elevó significativamente los niveles de BUN en los ratones ensayados a las 72 horas.

Ejemplo 4

Se repitió el ensayo con un oligopéptido (A) para determinar capacidad de reducción de los niveles de BUN en el ensayo en ratones, por las razones mencionadas anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 4 a continuación. Tal como se puede observar, los ratones a los que se le administró el oligopéptido LAGV ahora se comportaron mucho mejor en términos de supervivencia (una reducción significativa de la mortalidad en comparación con el grupo control de PBS) y la concentración de BUN reducida en comparación con el grupo de control (PBS).

Ejemplo 5

Se ensayaron cuatro oligopéptidos adicionales (G (VLPALPQ), H (VLPALP), I (LQGV) y J (LQG)) para determinar su capacidad para reducir los niveles de BUN en el ensayo en ratones, por las razones mencionadas anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 4 a continuación. Tal como se puede observar, los ratones a los que se le administró el oligopéptido LQG mostraron una concentración de BUN reducida temprano en el experimento (a las 24 horas posteriores a la reperusión) y los ratones a los que se le administró VLPALPQ lo hicieron mucho mejor en términos de concentración de BUN reducida al final del experimento (a las 72 horas posteriores a la reperusión) que el grupo de control (PBS) o el grupo al que le administraron los otros oligopéptidos, con más ratones supervivientes y siendo los niveles séricos de urea mucho menores que en los otros grupos.

TABLA 4. BUN después de 25 min de isquemia renal ensayada en ratones con los péptidos A-J

Péptido		t=0 h	2 h	24 h	72h	C-term:	CARBOXILO
						N-term:	LIBRE
A	Promedio	8,166667	14,03333	38,86364	32,8875	NMPF-47	LAGV
	sd	1,774658	1,011599	14,54711	14,31228		
	N	18	3	11	8		
B	Promedio	9,71333	16,62	26,36	22,31	NMPF-46	AQGV
	sd	1,882722	2,185203	20,62105	15,96444		
	N	30	10	20	10		
C	Promedio	10,15185	18,13333	59,24375	74,4	NMPF-44	LAG
	sd	1,789794	1,88326	16,19662	33,12546		
	N	29	6	16	6		
D	Promedio	9,303846	17,7	66,75625	91,18333	NMPF-43	AQG
	sd	1,502127	1,561135	24,50445	51,22154		
	N	26	8	16	6		
E	Promedio	8,403846	17,13	66,23333	104,0167	NMPF-12	MTR
	sd	1,739076	1,625526	17,55069	48,97193		
	N	26	10	6	6		
F	Promedio	7,462963	15,08571	34,57368	39,8375	NMPF-11	MTRV
	sd	1,338526	1,422941	15,18083	21,45973		
	N	30	7	18	8		
G	Promedio	8,256667	13,58	37,79375	37,6375	NMPF-7	VLPALPQ
	sd	1,304021	1,927462	18,33007	29,32872		
	N	30	7	18	8		
H	Promedio	8,423333	16,24	62,4	47,05	NMPF-6	VLPALP
	sd	1,255521	1,370482	13,33867	20,92728		
	N	30	10	9	7		
I	Promedio	7,518182	17,53333	56,08333	73,17778	NMPF-4	LQGV
	sd	1,537356	2,956913	14,53573	23,3083		
	N	22	3	18	9		
J	Promedio	7,83069	16,75	26,74	83,95714	NMPF-3	LQG
	sd	1,330515	1,44123	15,51796	40,32129		
	N	29	8	9	8		
PBS control	Promedio	8,172414	15,0875	56,81	82,075		
	sd	1,549169	2,215167	22,4659	34,82713		
	N	29	8	15	4		

El análisis estadístico a las 2 horas después de la reperusión reveló los valores de p:

- A p = 0,0491 NMPF-47 LAGV
- B p = 0,0008 NMPF-46 AQGV
- C p = 0,9248 NMPF-44 LAG
- D p = 0,4043 NMPF-43 AQG
- E p = 0,1848 NMPF-12 MTR

- F p = 0,0106 NMPF-11 MTRV
- G p = 0,1389 NMPF-7 VLPALPQ
- H p = 0,5613 NMPF-6 VLPALP
- I p = 0,9301 NMPF-4 LQGV
- J p = 0,0030 NMPF-3 LQG

El análisis estadístico a las 24 horas después de la reperusión reveló los valores de p:

- A p = 0,0017 NMPF-47 LAGV
- B p < 0,0001 NMPF-46 AQGV
- C p = 0,8186 NMPF-44 LAG
- D p = 0,2297 NMPF-43 AQG
- E p = 0,0242 NMPF-12 MTR
- F p = 0,0021 NMPF-11 MTRV
- G p = 0,0049 NMPF-7 VLPALPQ
- H p = 0,3297 NMPF-6 VLPALP
- I p = 0,8328 NMPF-4 LQGV
- J p = 0,9445 NMPF-3 LQG

Los valores de p se calcularon mediante la prueba U de Mann Whitney (SPSS para Windows).

Ejemplo 6

Para determinar las relaciones dosis-respuesta, también se ensayaron dos péptidos (D (GCA, que tiene un buen efecto sobre la mortalidad en los ratones ensayados en el Ejemplo 3) y B (AQGV), que también tienen un efecto superior sobre BUN de los ratones ensayados en el Ejemplo 3) en una manera dosis-respuesta en el ensayo de insuficiencia renal en ratón, tal como se describió anteriormente. Los péptidos se ensayaron a dosis de 0,3, 1,3, 10 y 30 mg/kg administradas tal como se describió en el Ejemplo 3. Los valores de P (calculados por la prueba U de Mann Whitney (SPSS para Windows)) de los niveles de urea en suero de los grupos de PBS en comparación con el péptido D a las 72 horas posteriores al pinzamiento fueron a 0,3 mg/kg de 0,001, a 1 mg/kg de 0,009, a 3 mg/kg de 0,02, a 10 mg/kg de 0,000, y a 30 mg/kg de 0,23, para los grupos del péptido B estos valores de p fueron 0,88, 0,054, 0,000, 0,001 y 0,003. Tal como se puede observar, el péptido D (AQG) redujo los niveles de BUN sorprendentemente bien a las dosis más bajas ensayadas, en comparación con el péptido B (AQGV), mientras que el efecto beneficioso sobre la mortalidad fue también notable aún en las dosis más bajas ensayadas.

Tabla 5 Mortalidad en el experimento de dosis-respuesta	24 h	72 h
PBS	0-9	4-8
AQG 0,3 mg/kg	0-10	2-8
AQG 1,0 mg/kg	0-10	1-8
AQG 3,0 mg/kg	0-10	0-10
AQG 10,0 mg/kg	0-8	1-10
AQG 30,0 mg/kg	0-8	1-8
AQGV 0,3 mg/kg	0-9	2-10
AQGV 1,0 mg/kg	0-10	1-8
AQGV 3,0 mg/kg	1-10	0-10
AQGV 10,0 mg/kg	0-10	0-8
AQGV 30,0 mg/kg	0-8	3-10

Tabla 6 Niveles de urea en el experimento de dosis-respuesta		
	24 h	72 h
PBS	57,8	85,4
Péptido D (AQG) 0,3 mg/kg	38,4	30,4
Péptido D (AQG) 1,0 mg/kg	48,4	38,4
Péptido D (AQG) 3,0 mg/kg	39,3	40,3
Péptido D (AQG) 10,0 mg/kg	46,8	25,8
Péptido D (AQG) 30,0 mg/kg	52,8	58,9
Péptido B (AQGV) 0,3 mg/kg	62,4	86,7
Péptido B (AQGV) 1,0 mg/kg	50,0	52,6
Péptido B (AQGV) 3,0 mg/kg	37,4	19,6
Péptido B (AQGV) 10,0 mg/kg	41,2	37,1
Péptido B (AQGV) 30,0 mg/kg	47,8	38,0
Error estándar		
	24 h	72 h
PBS	7,1	14,7
Péptido D (AQG) 0,3 mg/kg	8,6	3,5
Péptido D (AQG) 1,0 mg/kg	7,2	10,2
Péptido D (AQG) 3,0 mg/kg	3,5	10,7
Péptido D (AQG) 10,0 mg/kg	8,0	3,4
Péptido D (AQG) 30,0 mg/kg	9,5	12,9
Péptido B (AQGV) 0,3 mg/kg	10,8	14,1
Péptido B (AQGV) 1,0 mg/kg	11,7	14,3
Péptido B (AQGV) 3,0 mg/kg	7,6	2,6
Péptido B (AQGV) 10,0 mg/kg	8,5	6,9
Péptido B (AQGV) 30,0 mg/kg	5,8	7,8

Tabla 7 Significación estadística / valores de p (prueba U de Mann Whitney) de los niveles séricos de urea en el experimento dosis-respuesta a las 72 horas después del pinzamiento. Control de PBS en comparación con los grupos a los que se les administraron los péptidos.		72 h
PBS		NA
AQG 0,3 mg/kg		0,001
AQG 1,0 mg/kg		0,009
AQG 3,0 mg/kg		0,02
AQG 10,0 mg/kg		0,000
AQG 30,0 mg/kg		0,23
AQGV 0,3 mg/kg		0,88
AQGV 1,0 mg/kg		0,054
AQGV 3,0 mg/kg		0,000
AQGV 10,0 mg/kg		0,001
AQGV 30,0 mg/kg		0,003

- 5 Se establecieron experimentos de shock séptico para determinar qué péptido era el más adecuado para combatir la inflamación aguda.

10 Ratones utilizados en los experimentos de shock séptico: ratones BALB/c hembras de 8 a 12 semanas de edad se utilizaron para todos los experimentos. Los animales fueron criados en nuestras instalaciones en determinadas condiciones libres de patógenos de acuerdo con los protocolos descritos en el Informe de Asociaciones Europeas de Ciencias de Animales de Laboratorio (FELASA) Grupo de Trabajo sobre Salud Animal (Laboratory Animals 28: 1-24, 1994).

15 Protocolos de inyección: Para el modelo de endotoxina, los ratones BALB/c se inyectaron i.p. con 150-300 µg de LPS (*E. coli* 026: B6; Difco Lab., Detroit, MI, EE.UU.). Los grupos de control se trataron solo con PBS i.p. Para ensayar el efecto de los péptidos, se disolvieron en PBS y se inyectaron i.p. en puntos predeterminados de tiempo después del tratamiento con LPS.

20 Los ratones fueron puntuaron por la gravedad de la enfermedad utilizando el siguiente esquema de medición:

0 No hay anormalidades.

1 Pelo percolado, pero sin diferencias de comportamiento detectables en comparación con los ratones normales.

2 Pelo percolado, reflejo confuso, responde a los estímulos (tal como golpes en la jaula), tal activos durante la manipulación como los ratones sanos.

3 Respuesta más lenta al golpear en la jaula, pasivo o dócil cuando se manipula, pero aún curioso cuando está solo en un nuevo escenario.

4 Falta de curiosidad, poca o ninguna respuesta a los estímulos, bastante inmóvil.

5 5 Dificultad para respirar, dificultad o lentitud al incorporarse después de que rodar sobre la espalda (moribundo, sacrificado).

D Dead

10 Se establecieron una primera serie de experimentos de shock séptico para determinar cuál de los péptidos LQG, LQGV, VLPALP, VLPALPQ, MTR, MTRV, VVC o QVVC eran capaces de inhibir el shock séptico inducido por lipopolisacárido (LPS) en ratones mediante el tratamiento de los ratones con una dosis única de péptido dos horas después del tratamiento con LPS. Los péptidos se utilizaron a 5 mg/kg de peso corporal, los ratones BALB/c se inyectaron i.p. con dosis crecientes de LPS (*E. coli* 026:B6; Difco Lab, Detroit, MI, EE.UU.), predeterminadas para que conduzcan a un 80 - 100% de mortalidad a las 24-72 horas. Los grupos de control se trataron solo con PBS i.p. y no mostraron mortalidad.

15 Un segundo conjunto de experimentos de shock séptico se establecieron para determinar cuál de los péptidos LQG, LQGV, VLPALP, VLPALPQ, MTR, MTRV, VVC o GCA, AQGV, LAG y LAGV eran capaces de inhibir shock séptico inducido por dosis altas de LPS en ratones mediante el tratamiento de los ratones con una dosis doble de péptido a las 2 y 24 horas después del tratamiento con LPS. En cada tratamiento, los péptidos se utilizaron a 5 mg/kg de peso corporal. Los ratones BALB/c se inyectaron i.p. con dosis altas de LPS (*E. coli* 026:B6; Difco Lab, Detroit, MI, USA.), predeterminadas para que conduzcan a un 80 - 100% de mortalidad en 24-72 horas. Los grupos de control se trataron solo con PBS i.p. y no mostraron mortalidad.

25 Se establecieron un conjunto adicional de experimentos de shock séptico para determinar cuál de los péptidos LQG, LQGV, VLPALP, VLPALPQ, MTR, MTRV, VVC o AQGV bajo estudio eran los más adecuados para ser utilizados de forma temprana y/o tardía después o durante todo el desarrollo del shock. Para determinar el porcentaje de supervivencia al shock de endotoxina después del tratamiento temprano o tardío con el péptido, los ratones BALB/c se inyectaron i.p. con 300 µg de LPS (*E. coli* 026:B6; Difco Lab, Detroit, MI, EE.UU.), predeterminada para que conduzca a un 100% de mortalidad en 48 horas sin tratamiento con el péptido. Los grupos de control se trataron solo con PBS i.p. y no mostraron mortalidad.

35 Se estableció un ensayo comparativo para comparar los péptidos MTR y AQGV, cada uno obtenido de dos fuentes comerciales. El ensayo comparativo comprendió seis grupos de seis animales; dos grupos (1A y 1B) que recibieron placebo (PBS), un grupo (2) de péptido MTR (fuente Pepscan), un grupo (3) que recibió el péptido MTR (fuente Ansynth), un grupo (4) que recibió el péptido AQGV (fuente Pepscan) y un grupo de péptidos AQGV (fuente Ansynth). El péptido/placebo en estos grupos se administró dos horas después del LPS. Se utilizó LPS (fuente) a 10-11 mg/kg. Las puntuaciones de enfermedad se realizaron a las 0, 2, 22, 26, 42 y 48 horas después de la inyección de LPS.

40 Resultados

Selección de péptidos

45 Se seleccionaron para la síntesis los péptidos MTR, MTRV, LQG, LQGV, VLPALP y VLPALPQ, así como QVVC y VVC. En una fase posterior del estudio también se seleccionaron para la síntesis las variantes de péptidos de sustitución con alanina derivados de LQG y LQGV, en los que se llevó a cabo una única sustitución de un aminoácido con alanina; cuatro (AQG, AQGV, LAG, y LAGV) los resultados de los cuales se presentan en el presente documento.

50 Experimentos de shock séptico

55 Para probar el efecto del péptido temprano en el desarrollo del shock, los ratones se trataron a las dos horas o a las 24 horas después del tratamiento con diferentes dosis de LPS mediante inyección i.p. con el péptido de ensayo a 5 mg/kg de peso corporal. Todas las dosis de LPS resultaron en una mortalidad del 100% a las 48-72 horas en los ratones tratados sin péptidos. Los resultados se muestran en la tabla 8. De los siete péptidos ensayados, el péptido VLPALP y LQGV mostraron un marcado efecto protector contra la sepsis inducida por LPS.

Tabla 8		Administración de dosis única 5 mg/kg																
			Efecto a t = 24 h								Efecto a t = 48 h							
Péptido ensayado	Dosis LPS	n	0	1	2	3	4	5	D	0	1	2	3	4	5	D		
LQG	7*	6					3	3							2	4		
	7**	6					3	2	1					1		5		
	8	6			2	1	3						1	2	3			
	8	6					1	4	1							6		
	10	6					2	4							2	4		
	10	6				1	2	3						1	2	3		
LQGV	7*	6		2	4						6							
	7**	6		6							6							
	8	6			5	1					5	1						
	8	6		3	3					4	2							
	10	6			6						6							
	10	6		2	2	1	1				4	1				1		
VLPALP	7*	6		4	2						5	1						
	7**	6		5	1						5	1						
	8	6			5	1					3	2	1					
	8	6		3	3					2	3	1						
	8	6			2	4					5	1						
	8	6		2	4						5	1						
	9	5			3	1	1				1	2	1			1		
	9	6		2	4						5	1						
	9	6			3	2	1				2	1	1		2			
	10	6			3		3				3		2					
	10	6			4		2				2	2				2		
VLPALPQ	7*	6				3	3							2	2	2		
	7**	6						5	1							6		
	8	6			1	3	2						1	3	2			
	8	6					1	3	2							6		
	10	6					2	4							1	5		
	10	6				1		2	3						1	5		
VVC	7*	6				4	2					4			2			
	7**	6				2	1	2	1		1	1	1			3		
	10	6			2	2	2				2	2			2			
MTRV	7*	6				3	3					4			2			
	7**	6				2	3	1			3		1			2		
	10	6			2	1	2	1			2	1	1		1	1		
	10	6			1	2	1	2				3				3		
MTR	7*	6				3	3							2	3	1		
	7**	6			1	3	1	1			3					3		
	10	6				2	3		1		2				1	3		

Tabla 9																		
Péptido administrado dos veces (t=2 h y t=24 h) 5 mg/kg a dosis alta de LPS																		
			Efecto a t = 24 h								Efecto a t = 48 h							
Péptido ensayado	Dosis LPS	n	0	1	2	3	4	5	D	0	1	2	3	4	5	D		
LQG	10,5	5						5								5		
	11	6					6									6		
LQGV	10,5	5						5								5		
	11	6					2	4						2		4		
VLPALP	10,5	5						5								5		
	11	6					2	4						1		6		
VLPALPQ	10,5	5			1	2		2				3				2		
	11	6						6				4				2		
	11	6						6				2		3	1			
VVC	10,5	5			5						2	3						
	11	6			6						2	4						
MTRV	10,5	5			1	1	3				2	3						

Tabla 9														
Péptido administrado dos veces (t=2 h y t=24 h) 5 mg/kg a dosis alta de LPS														
			Efecto a t = 24 h							Efecto a t = 48 h				
	11	6			4		2			6				
MTR	10,5	5		4	1					5				
	11	6		6						6				
AQG	10,5	5		2	1	2				2	3			
	11	6		4		2					6			
LAG	10,5	5						5						6
	11	6						6						6
AQGV	10,5	6		2	3					5				
	11	4		2	4					6				
LAGV	10,5	5				1		4				1		4
	11	6				1	1	3	1			2		4

Para evaluar el efecto del tratamiento con péptido en un momento temprano o tardío en el tiempo de desarrollo del shock, los ratones fueron tratados a las dos horas o a las 24 después de la inyección de LPS por inyección i.p. con el péptido de ensayo a 5 mg/kg de peso corporal. Los ratones fueron seguidos durante 84 horas en lugar de durante 48 horas en los experimentos anteriores. Los resultados se muestran en la tabla 10. De todos los péptidos ensayados, sólo AQGV mostró un 100% de supervivencia y sin signos clínicos del shock que permanecen a las 84 horas después del tratamiento con LPS, cuando se administró temprano o tarde en el desarrollo del shock.

Tabla 10

Porcentaje de ratones supervivientes a sepsis inducida por LPS después del tratamiento con una única inyección de péptido de ensayo (5 mg/kg de peso corporal) a las 2 ó 24 horas después de la inducción de la sepsis por tratamiento con LPS.

TRATAMIENTO 2 HORAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LPS						TRATAMIENTO 24 HORAS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON LPS					
		% de supervivencia en el tiempo (h)					% de supervivencia en el tiempo (h)				
	0	14	24	48	84		0	14	24	48	84
PBS	100	100	100	0	0	PBS	100	100	100	0	0
LQG	100	100	100	0	0	LQG	100	100	100	0	0
LQGV	100	100	100	100	100	LQGV	100	100	100	0	0
VLPALP	100	100	100	100	100	VLPALP	100	100	100	0	0
VLPALPQ	100	100	100	0	0	VLPALPQ	100	100	100	100	100
MTR	100	100	100	100	50	MTR	100	100	100	100	100
MTRV	100	100	100	50	30	MTRV	100	100	100	100	100
VVC	100	100	100	80	50	VVC	100	100	100	100	100
AQGV *5 mg/kg pc	100	100	100	100	100	AQGV	100	100	100	100	100
						n=10					

Ensayo comparativo de MTR y AQGV, cada uno derivado de dos fuentes, todos a 5 mg/kg.

Tabla 11

LPS = 10 - 11
mg / kg

970 = 5 mg/kg de LPS compuesto

971 = 5 mg/kg tratamiento tratamiento

#Ansynth 12

#Ansynth 46

puntuaciones de enfermedad

	Núm.	0 h	2 h	22 h	26 h	42 h	48 h	% de supervivencia
Grupo 1A PBS	1	0	2	4	4	5	muerto	
	2	0	2	3	3	5	muerto	
	3	0	2	5	muerto			
	4	0	2	3	3	3	2	
	5	0	2	4	4	muerto		
	6	0	2	5	5	muerto		
Grupo 1B PBS	1	0	2	4	4	4	muerto	
	2	0	2	5	muerto			
	3	0	2	3	3	2	1	
	4	0	2	4	muerto			
	5	0	2	4	4	5	muerto	
	6	0	2	5	5	muerto		
Grupo 2 # 970 MTR Diosynth BV	1	0	2	muerto				17%
	2	0	2	3	3	5	muerto	
	3	0	2	2	2	2	2	
	4	0	2	2	2	2	2	
	5	0	2	2	2	4	muerto	
	6	0	2	4	5	muerto		33%
Grupo 3 #Ansynth 12 MTR	1	0	2	2	1	1	1	
	2	0	2	2	2	2	1	
	3	0	2	4	5	muerto		
	4	0	2	3	4	4	muerto	
	5	0	2	2	3	5	muerto	
	6	0	2	2	2	2	2	50%
Grupo 4 # 971 AQGV Diosynth BV	1	0	2	2	2	2	2	
	2	0	2	3	3	2	1	
	3	0	2	2	2	2	2	
	4	0	2	2	2	2	2	
	5	0	2	4	5	muerto		
	6	0	2	2	3	2	1	83%
Grupo 5 #Ansynth 46 AQGV	1	0	2	3	3	2	1	
	2	0	2	3	3	3	1	
	3	0	2	2	2	1	1	
	4	0	2	4	4	5	muerto	
	5	0	2	2	2	1	1	
	6	0	2	2	2	1	1	83%

- 5 Varios informes han sugerido la modulación del sistema inmune por la hCG intacta, pero dichos efectos de los productos de descomposición no se han dado a conocer en la literatura científica. Benner y Khan (Scand. J. Immunol. Jul 2005; 62 Suppl 1:62-6) estudiaron la posible actividad inmunológica de fragmentos de péptidos liberados *in vivo* procedentes de una parte de la secuencia MTRVLQGVLPAIPQVVC (residuos 41-57) del bucle 2 de la subunidad beta de hCG, en lugar del hecho de que los péptidos tan pequeños como de tres a siete aminoácidos generalmente no se supone que tengan una actividad biológica significativa.

10 Se han diseñado péptidos que bloquean completamente el shock séptico inducido por LPS en ratones, en varios casos incluso cuando el tratamiento con estos péptidos se inicia hasta 24 horas después de la inyección de LPS. Estos péptidos son también capaces de inhibir la producción de MIF. Este hallazgo proporciona la posibilidad de un

15 uso terapéutico de estos péptidos para el tratamiento de pacientes que sufren de lesión por radiación.

Ejemplo 7

- 20 En este ejemplo se muestran los resultados del experimento con el péptido AQGV sobre Irradiación de Todo el Cuerpo (WBI) de ratones con 8,6 Gy, en el que todos los grupos de ratones recibieron la primera inyección 3 horas después de WBI. El grupo que recibió una inyección de placebo experimentó una mortalidad del 80%, según lo previsto en este modelo. La dosis de radiación administrada (8,6 Gray = 8,6 Gy) es conocida que causa en esta especie una mortalidad del 80%, por lo que se denomina LD80 (dosis letal para el 80%). Las muertes comenzaron
- 25 en torno al Día 10 - lo que es típico de lo que ocurre en WBI a los animales o a los seres humanos: En torno al Día 10, el revestimiento del intestino está tan dañado y agujereado por la radiación, que las bacterias penetran en la

circulación y causan la sepsis debido al Síndrome Gastrointestinal (GI), y la médula ósea está tan dañada, que no hay suficientes glóbulos blancos para combatir la infección ("Síndrome de Médula Ósea"), y se produce la muerte.

5 Un primer grupo de grupo de ratones tratados con péptido con "x" como símbolo (figura 1) recibió la primera inyección con AQGV IV, y la segunda inyección por vía subcutánea (SC) 3 horas después de la primera inyección. Sorprendentemente, el 100% de estos sobrevivieron. Además, los animales no mostraron ningún signo de enfermedad en absoluto. Para un observador externo, se verían como ratones perfectamente normales, en particular, los ratones tratados con péptido no mostraron el síndrome gastrointestinal.

10 Un segundo grupo de ratones recibieron su primera inyección del péptido por vía SC. A continuación, recibieron inyecciones adicionales SC cada 48 horas, para un total de 3 dosis (además de la primera dosis) - es decir, en el Día 3, Día 5, y el día 7. Cabe señalar que sólo uno de estos animales murió, los otros no mostraron ningún síntoma del síndrome gastrointestinal.

15 El tercer grupo de ratones fue idéntica en los procedimientos al segundo grupo, a excepción de que las inyecciones SC cada 48 horas continuaron hasta que se habían inyectado un total de 6 dosis (además de la primera dosis). Así, la dosificación continuó hasta el Día 13. Cabe señalar que esta prolongación del tratamiento se asoció con una protección completa (sin mortalidad alguna en este grupo). Los animales de este grupo no mostraron signos de enfermedad, de nuevo no mostraron ningún síntoma del síndrome gastrointestinal.

20 Lo que se puede concluir de estos datos es que cuando los animales recibieron dos dosis de péptido en el primer día (siendo la primera IV), con AQGV hubo una protección completa contra una dosis altamente letal de WBI, y en particular contra el síndrome gastrointestinal asociado con esa dosis. Cuando los animales recibieron un tratamiento de menor nivel (sólo SC), si el tratamiento se prolongó hasta la segunda semana, una vez más hubo una
25 protección completa y en particular contra el síndrome gastrointestinal asociado con la dosis alta utilizada.

Cuando se comparan estos resultados con la información publicada en los estudios que describen la actividad de protección contra la radiación de un medicamento cuyo nombre en código es ON-01210, que se presentaron en la 51ª Sociedad de Investigación sobre la Radiación (Abril, 2004), muestran que este fármaco en particular ON-01210
30 (al igual que otros fármacos no peptídicos que se encuentran actualmente bajo investigación de exposición a la radiación) es protector sólo si se administra antes de la exposición a la radiación. Eso hace que no sea muy útil para la protección contra las bombas sucias. Este medicamento en particular tiene un componente sulfhidrido (4 carboxistiril-4-clorobencilsulfona) que funciona como un antioxidante, secuestrando los radicales libres que se generan ya que la radiación daña las células. Si no está presente en el cuerpo en el momento de la exposición a la
35 radiación, no tiene efecto alguno. Por el contrario, el tratamiento con un péptido, según la presente invención funciona después de la exposición.

Además, al revisar el tratamiento con otros fármacos disponibles, todos los datos actuales dados a dichos fármacos (es decir, el tratamiento con esteroides anabólicos) muestran la necesidad para los actuales fármacos no peptídicos
40 de ser aplicados antes (es decir, 24 horas) de WBI, la administración más tarde no tiene efecto alguno en apoyo a la protección contra lesiones por radiación aguda.

Ejemplo 8, estudios de DRF.

45 En este ejemplo se informa sobre los estudios de dosis crecientes de Irradiación de Todo el Cuerpo (WBI), con una exposición única recibida por cualquier grupo en particular, y la dosis de exposición va aumentando progresivamente para cada grupo posterior. Se administró una sola dosis de péptido AQGV (10 mg/kg) por vía subcutánea, pero con tratamiento retrasado hasta tres días (72 h) tras la WBI. El ensayo se denominó factor de reducción de dosis ("DRF"), que se define como la relación entre la LD50 del grupo tratado con respecto a la LD50 del grupo de control.
50 La LD50 se refiere a la dosis que es letal para el 50% de los animales ensayados.

Una relación de DRF aceptable es un factor, como mínimo, de 1,10; pero es preferente, como mínimo, de 1,20 o incluso, como mínimo, de 1,25. Para pasar la prueba para DRF de 1,20, en el día 30 después de WBI un fármaco candidato debe tener una LD50 a una dosis de radiación que, como mínimo, es mayor del 20% (un aumento por un
55 factor de 1,20) de la dosis LD50 para los animales de control. Si por ejemplo, la LD50 para los animales de control es de 8,2 Gy, entonces, para pasar esta prueba, la LD50 para un fármaco candidato tendría que ser, como mínimo, un 20% mayor, que en este caso significa una dosis de $8,2 \times 1,20 = 10,4$ Gy.

El número de animales ensayados y los resultados del ensayo DRF se muestran en la tabla 12.

60

Tabla 12

Dosis (Gy)	"n"	Número absoluto de animales vivos a los 30 días posteriores a WBI	Porcentaje vivo en el día 30	Porcentaje muerto en el día 30
7,4	50	45	90%	10%
8	100	60	60%	40%
8,6	120	24	20%	80%
9,2	30	0	0%	100%
8,6 + AQGV en el día 3	20	20	100%	0%
9,2 + AQGV en el día 3	10	10	100%	0%
9,8 + AQGV en el día 3	10	10	100%	0%
10,4 + AQGV en el día 3	10	4	40%	60%
11,0 + AQGV en el día 3	10	0	0%	100%

- 5 Es importante explicar los fundamentos de la decisión de retrasar el tratamiento en 72 horas: En algunos escenarios de exposición radiactiva (por ejemplo, la explosión de un artefacto de fisión nuclear en un buque de carga, o un avión que se estrella contra un reactor nuclear cerca de centros metropolitanos, etc), la cantidad de destrucción podría ser tal, que se podrían requerir varios días para llevar a todas las víctimas a los centros de tratamiento. Por lo tanto, los científicos militares (interesados en la protección de los primeros respondedores) y los científicos civiles (interesados en el tratamiento de las víctimas en masa), naturalmente, quieren determinar si un fármaco candidato puede hacer algo para disminuir la toxicidad por radiación aguda (Síndrome gastrointestinal, Síndrome de Médula Ósea), que de otra manera es fulminante después de tanto retraso.

- 15 Resultados del ensayo DFR con AQGV. La dosis de radiación que mata el 50% de los controles resultó ser aproximadamente de 8,2 Gy. El péptido AQGV es tan protector que hay que aumentar la dosis de radiación en un 25% (un factor de 1,25), hasta aproximadamente 10,4 Gy, para matar el 50% de los animales, y esto es con el tratamiento retrasado tres (3) días. Si el tratamiento se había dado antes, por ejemplo, a las 24 h o 48 h, se habría tomado una dosis aún mayor de radiación para matar el 50% de los animales.

20 Ejemplo 9

- 25 Para estudiar más a fondo la actividad anti-ciclo celular de varios oligopéptidos se llevó a cabo un experimento de proliferación en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. El objetivo era ensayar un grupo de 140 oligopéptidos de longitud variable para determinar su efecto sobre la expresión del gen marcador de la planta durante el crecimiento rápido cuando se produce la división celular ávida. Ambos genes marcadores están relacionados con el proceso del ciclo celular, alta actividad del marcador representa alta actividad del ciclo celular y ninguna actividad del marcador representa ninguna actividad del ciclo celular y, por lo tanto, ninguna proliferación. Ejemplos del efecto de los oligopéptidos en el análisis del ciclo celular de *Arabidopsis thaliana* se muestran en la figura 3.

30 Método

- 35 Los péptidos se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS) 1x, pH 8 a una concentración final de 5 mg/ml. Las soluciones obtenidas se dividieron, a continuación, mediante de placas de fondo redondo de 96 pocillos (Corning Incorporated) a 40 microlitros por pocillo. Las placas se almacenaron antes de su uso a -20°C durante cuatro días. Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Ws-0 se esterilizaron en superficie en lejía comercial al 2% (Glorix) durante 10 minutos y se lavaron cinco veces con agua MQ estéril. A continuación, las semillas se resuspendieron con agar al 0,1% y se sembraron en placas MS20 suplementadas con kanamicina a 80 mg/l.

- 40 Las placas se colocaron a 4°C durante 2 noches, y, a continuación, se trasladaron a una sala climatizada a 21°C y un fotoperíodo de 16/8 horas. Después de cuatro días de crecimiento, las plántulas se transfirieron a placas de 96 pocillos que contienen las soluciones de péptidos (4 plántulas por pocillo) y se incubaron durante 4 y 8 horas.

- 45 Para este experimento, se utilizaron plántulas homocigóticas de *Arabidopsis* portadoras de dos genes indicadores fusionados a GUS. El primer gen indicador utilizado fue un marcador de ciclo celular, pCDG (Carmona y otros, The Plant Journal, 1999, 20 (4), 503-508), y el segundo un marcador sensible a auxina, DRS::GUS (Ulmasov y otros, The Plant Cell, vol. 9, 1963-1971). Después de la incubación con los compuestos, las plántulas se tiñeron para determinar GUS. La reacción de tinción se realizó en 100 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,0) que contenía 10 mM EDTA, 10% de DMSO, 0,1% de Triton X-100, 2 mM de X-Gluc, 0,5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ y 0,5 mM de $K_4Fe(CN)_6$ a 37°C durante 16 horas. Para detener la reacción de GUS y eliminar la clorofila, las plántulas se trataron

posteriormente durante una hora con etanol al 96% y después se almacenaron en etanol al 70%. Las plántulas teñidas se observaron bajo un microscopio estereoscópico y se prepararon portaobjetos con plántulas que muestran un efecto del tratamiento con el compuesto. Las plántulas se fijaron y se aclararon en solución de hidrato de cloral para la observación microscópica detallada y fotografía en un microscopio equipado con óptica DIC.

Resultados

Los péptidos se ensayaron para determinar un efecto sobre la expresión del gen marcador en el crecimiento rápido de plántulas de *Arabidopsis*. Esto fue seguido por los cambios en la distribución de GUS en diferentes órganos: raíz, zona de transición raíz-hipocótilo y cotiledones.

De los 140 compuestos ensayados, un total de 43 mostraron un claro efecto sobre la expresión de ambos marcadores ensayados. Ejemplos de cambios significativos causados por los compuestos ensayados se muestran en detalle en el nivel microscópico para los péptidos LQGV, VVC y DINGFLPAL en la figura 3. Sorprendentemente, los efectos estaban claramente relacionados con la longitud de los diversos péptidos ensayados. Tal como se puede observar en la Tabla 13 a continuación, la actividad anti-ciclo celular estuvo excesivamente representada en los péptidos cortos, ninguno de los péptidos de más de 9 aminoácidos mostró reducción de la actividad del ciclo celular. De los péptidos de 5 a 9 aminoácidos de longitud, alrededor del 22% mostraron reducción, pero de los trímeros y tetrameros ensayados, más de un 50% mostró una reducción de la actividad del ciclo celular.

Tabla 13

Distribución de frecuencia de los péptidos ensayados longitud positiva/péptido tal como se encuentra en el ensayo del ciclo celular en <i>Arabidopsis thaliana</i> . #AA = longitud del péptido en aminoácidos; # = número ensayado; #+ número de resultados positivos; %+ = porcentaje positivo											
#AA	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	>14
#	6	65	9	11	10	2	17	7	3	5	5
#+	3	38	3	3	3	1	1	0	0	0	0
%+	50%	58%	33%	27%	30%	50%	6%	0%	0%	0%	0%

Ejemplo 10

Para estudiar más a fondo la actividad anti- ciclo celular de varios oligopéptidos se llevó a cabo un experimento *in vitro* en células de sangre periférica de ratones estimulados con anti-CD3. El objetivo fue ensayar oligopéptidos representativos para determinar su efecto sobre la proliferación durante el crecimiento rápido inducido por CD3 cuando se produce la división celular ávida. Los ratones (n = 5) se trataron i.p. con PBS, Nak4 (LQGV), Nak47 (LAGV), Nak46 (AQGV) proporcionados por Ansynth BV, Países Bajos, o Nak46* (AQGV proporcionado por Diosynth BV, Países Bajos). Los ratones se trataron con 0,5 mg/kg o 5 mg/kg de péptido durante una hora después de lo cual se aislaron los bazo y se prepararon suspensiones de células de bazo. Las suspensiones de células de bazo se agruparon por grupos y se cultivaron *in vitro* (en tres veces) en presencia de PBS o de anticuerpo anti-CD3 y se evaluó la proliferación a las 0, 12, 24 y 48 horas después del cultivo. Todos los péptidos ensayados mostraron una reducción de la proliferación (véase figura 4).

Resultados de los ejemplos 9 y 10.

A partir de los estudios del ciclo celular en plantas y los estudios *in-vitro* de reducción de la proliferación en células de sangre periférica, se identificaron los péptidos 3-mer útiles para el tratamiento de las lesiones por radiación, VVC, LAG, AQG. Del mismo modo, péptidos 4-mer útiles para el tratamiento de las lesiones por radiación son LQGV, QVVC, MTRV, AQGV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, EMFQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG, YAIT, APSL, ITTL, QALG, GVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNL, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPQ, LQGA, LCFL, péptidos 5-mer útiles para el tratamiento de las lesiones por radiación son TLAVE, VEGNL, LNEAL, péptidos 6-mer útiles para el tratamiento de las lesiones por radiación son VLPALP, MGGTWA, LTCDDP, péptidos 7-mer útiles para el tratamiento de las lesiones por radiación son VLPAPLQ, VCNYRDV, CPRGVNP, un péptido 8-mer útil para el tratamiento de las lesiones por radiación es QPLAPLVG y un péptido 9-mer útil para el tratamiento de las lesiones por radiación es DINGFLPAL.

REFERENCIAS

Khan N.A., A. Khan, H.F. Savelkoul, R. Benner. Inhibition of septic shock in mice by an oligopeptide from the beta-chain of human chorionic gonadotropin hormone. Hum. Immunol. 2002 Jan; 63(1): 1-7.

Benner R., N.A. Khan. Dissection of systems, cell populations and molecules. Scand. J. Immunol. 2005 Jul; 62 Suppl 1:62-6.

- Cole L.A., A. Kardana, S. -Y. Park, G.D. Braunstein. The deactivation of hCG by nicking and dissociation. J. Clin. Endocr. Metab. 1993; 76:704-710.
- 5 Alftan H., U.H. Stenman. Pathophysiological importance of various molecular forms of human choriongonadotropin. Mol. Cell Endocrinol. 1996; 125: 107-120.
- Kardana A., M.M. Elliott, M.A. Gawinowicz, S. Birken, L.A. Cole. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). I. Characterization of peptide heterogeneity in 13 individual preparations of hCG. Endocrinology 1991; 129:1541-1550.
- 10 Cole L.A., A. Kardana, P. Andrade-Gordon, M.A. Gawinowicz, J.C. Morris, E.R. Bergert, J. O'Connor, S. Birken. The heterogeneity of human chorionic gonadotropin (hCG). III. The occurrence and biological and immunological activities of nicked hCG. Endocrinology 1991; 129:1559-1567
- 15 Birken S., Y. Maydelman, M.A. Gawinowicz. Preparation and analysis of the common urinary forms of human chorionic gonadotropin. Methods 2000; 21:3-14.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un péptido seleccionado del grupo que comprende VVC, LAG, AQG, LQGV, QVVC, MTRV, AQGV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, EMFQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG , YAIT, APSL, ITTL, QALG, GVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNH, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPG, LQGA, LCFL, TLAVE, VEGNL, LNEAL, VLPALP, MGGTWA, LTCDDP, VLPAPLQ, VCNYRDV, CPRGVNP, QPLAPLVG y DINGFLPAL para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que sufre o se cree que sufre de lesión por radiación.
2. Uso, según la reivindicación 1, en el que dicho péptido se selecciona del grupo que comprende VVC, LAG, AQG.
3. Uso, según la reivindicación 1, en el que dicho péptido se selecciona del grupo que comprende LQGV, QVVC, MTRV, AQGV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, EMFQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG , YAIT, APSL, ITTL, QALG, GVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNH, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPG, LQGA y LCFL.
4. Uso, según la reivindicación 3, en el que dicho péptido se selecciona del grupo que comprende LQGV, LAGV y AQGV.
5. Uso, según la reivindicación 4, en el que dicho péptido es AQGV.
6. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha lesión por radiación comprende lesión por radiación aguda.
7. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha lesión por radiación comprende daños en el recubrimiento del tracto intestinal de dicho sujeto, el denominado síndrome gastrointestinal.
8. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha lesión por radiación es lesión por irradiación.
9. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho tratamiento comprende la inyección subcutánea o intramuscular con dicho péptido
10. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha composición farmacéutica está contenida en una autoinyector.
11. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tratamiento comprende la administración de dicho péptido, como mínimo, 30 minutos después de la irradiación.
12. Autoinyector adecuado para la autoinyección de un medicamento, comprendiendo el autoinyector un péptido seleccionado del grupo que comprende VVC, LAG, AQG, LQGV, QVVC, MTRV, AQGV, LAGV, LQAV, PGCP, VGQL, RVLQ, EMFQ, AVAL, FVLS, NMWD, LCFL, FSYA, FWVD, AFTV, LGTL, QLLG , YAIT, APSL, ITTL, QALG, GVLC, NLIN, SPIE, LNTI, LHNH, CPVQ, EVVR, MTEV, EALE, EPPE, LGTL, VGGI, RLPG, LQGA, LCFL, TLAVE, VEGNL, LNEAL, VLPALP, MGGTWA, LTCDDP, VLPAPLQ, VCNYRDV, CPRGVNP, QPLAPLVG y DINGFLPAL.
13. Autoinyector, según la reivindicación 12, que comprende el péptido AQGV.
14. Autoinyector, según la reivindicación 12 ó 13, para utilizar en el tratamiento de las lesiones por radiación, preferentemente en la que dicha lesión por radiación comprende daños del recubrimiento del tracto intestinal de dicho sujeto, el denominado síndrome gastrointestinal.

Fig. 1

Supervivencia Kaplan-Meier de C57Bl/6 después de WBI w/wo EBI anti-sepsis B.V.
péptido

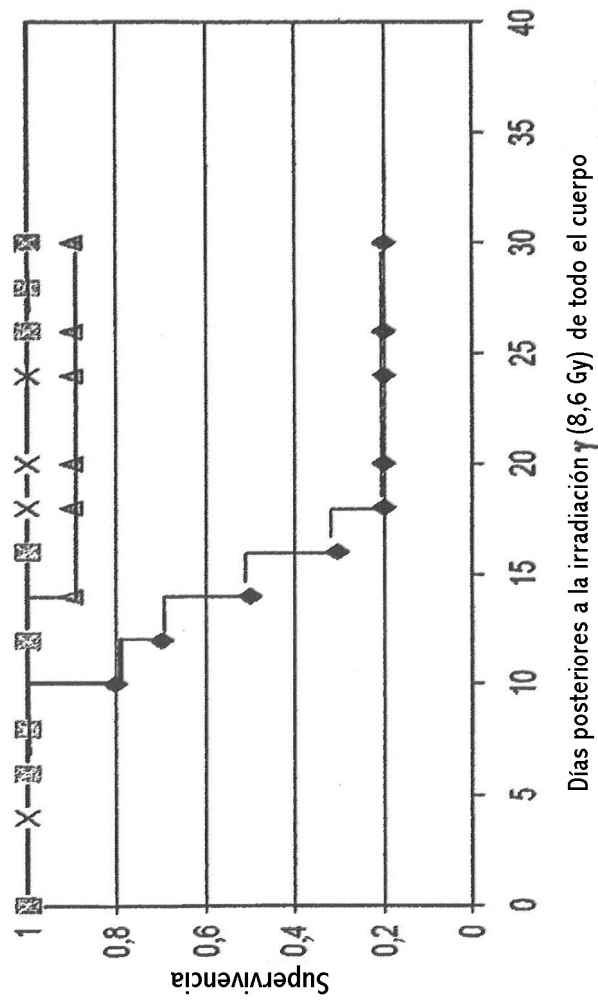


Fig. 2

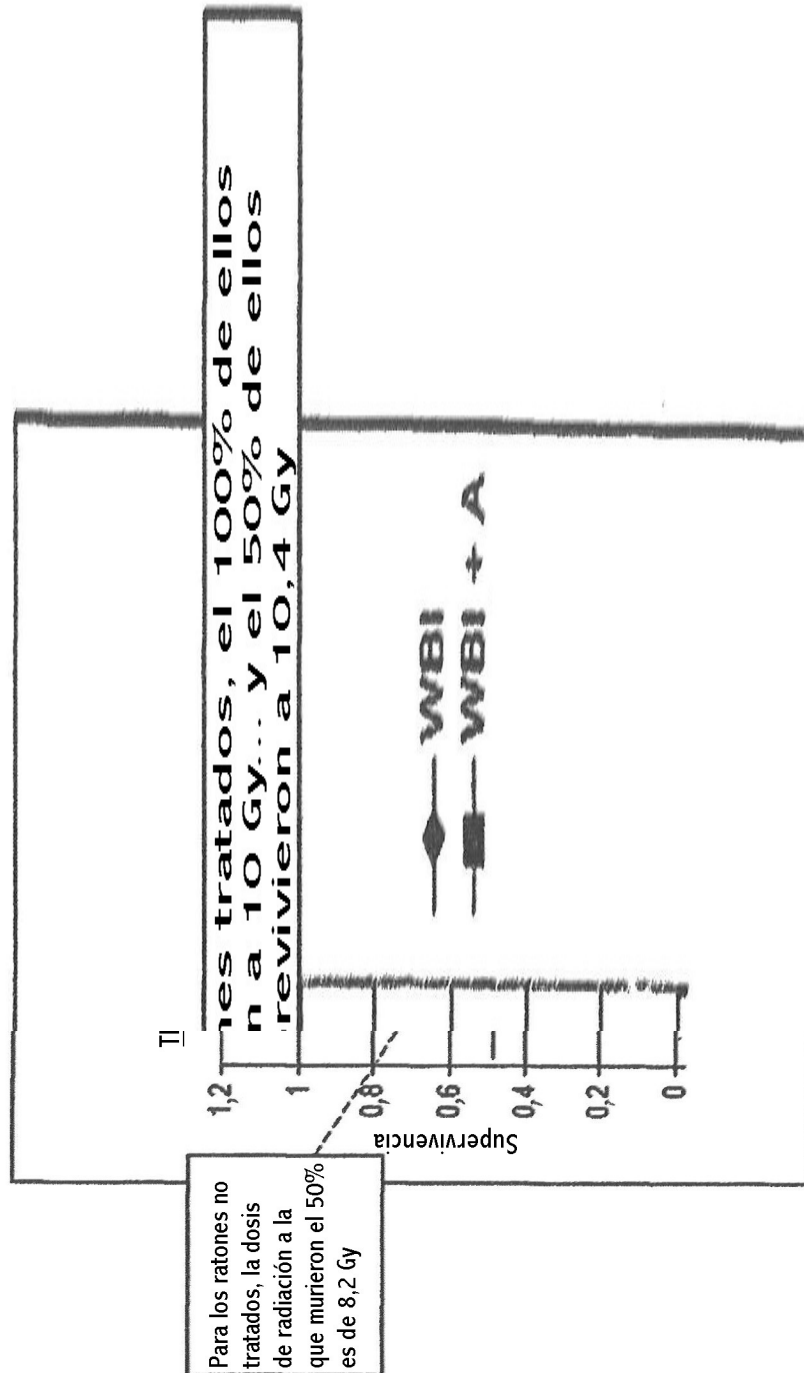


Fig. 3

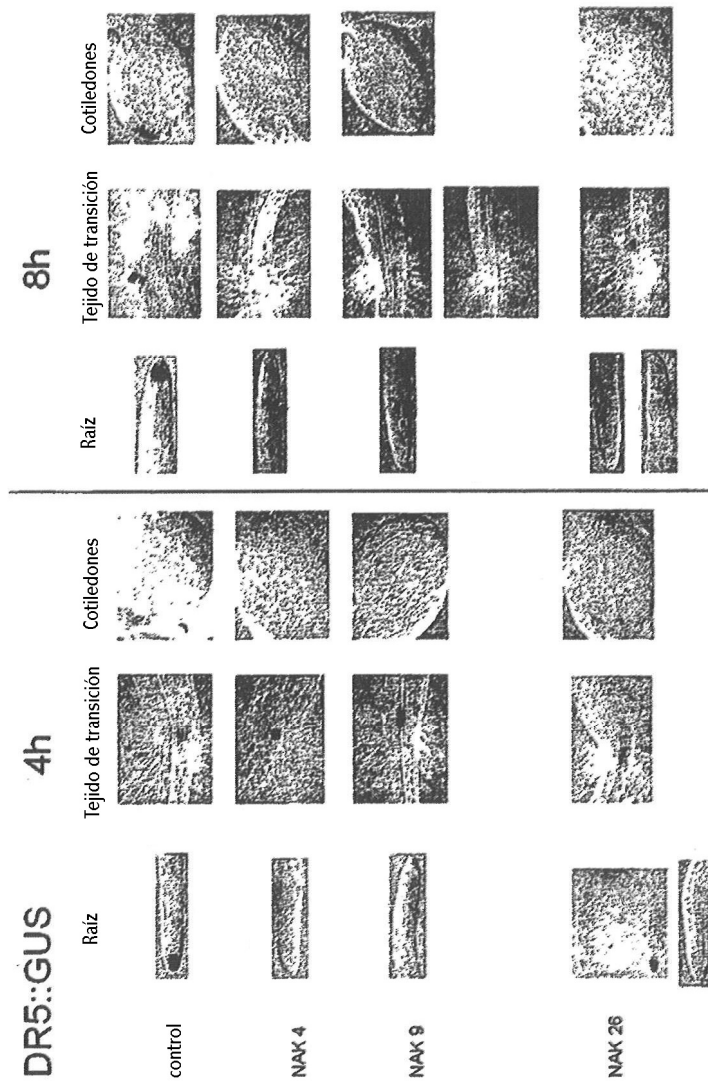


Fig. 4

gCD3 proliferación

$P < 0,05$
 $P < 0,08 < 0,06$

T=12

grupo	mg/kg i.p.	CCPM	AVG	SEM	valor p
PBS		413	591	590	101,9
NAK-4	0,5	305	372	321,7	25,6
NAK-46	0,5	449	616	519,0	50,1
NAK-47	0,5	154	465	354,3	100,4
NAK-48*	0,5	787	1760	1291,3	281,5
NAK-46*	0,5	148	273	268,3	66,5
	0,5	169	375	355,7	102,7
	0,5	299	60	154,7	73,3
	0,5	389	87	604	360,0

T=24

grupo	mg/kg i.p.	CCPM	AVG	SEM	valor p
PBS		7114	9395	8598,7	743,0
NAK-4	0,5	2359	1904	2244	2188,0
NAK-46	0,5	3017	3289	4143	3483,0
NAK-47	0,5	2552	4275	3367	3398,0
NAK-48*	0,5	4372	6860	8791	6874,3
	0,5	181	2586	3189	1888,7
	0,5	1554	2631	3518	2567,7
	0,5	1287	1306	162	921,7
	0,5	4527	72	2823	2474,0

T=36

grupo	mg/kg i.p.	CCPM	AVG	SEM	valor p
PBS		40051	61125	52417,0	6352,7
NAK-4	0,5	23926	23624	20520	22656,7
NAK-46	0,5	20352	25311	34935	26866,0
NAK-47	0,5	22921	26487	39461	29623,0
NAK-48*	0,5	33409	58790	43895	45364,7
	0,5	8888	20833	25977	18566,0
	0,5	15397	22297	23183	20292,3
	0,5	3751	2583	4191	3506,3
	0,5	28866	18485	33944	27438,3

T=48

grupo	mg/kg i.p.	CCPM	AVG	SEM	valor p
PBS		30814	45218	41992	39341,3
NAK-4	0,5	24325	21071	15146	20180,7
NAK-46	0,5	22413	24013	20795	22407,0
NAK-47	0,5	21410	29916	27089	26141,7
NAK-48*	0,5	65312	58347	55436	59698,3
	0,5	10160	21079	20152	17130,3
	0,5	11253	20791	17370	16471,3
	0,5	3091	1174	2821	2362,0
	0,5	25844	16048	21713	21201,7