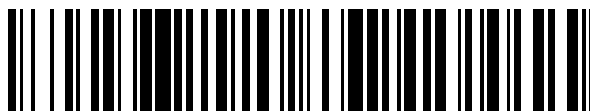


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 333**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2008 E 08712603 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2014 EP 2120991**

54 Título: **Tratamiento de hemorragia traumática con oligopéptidos cortos**

30 Prioridad:

12.02.2007 US 901155 P

23.07.2007 US 961841 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2014

73 Titular/es:

BIOTEMPT B.V. (100.0%)

Kneuterdijk 2

2514 EN Den Haag, NL

72 Inventor/es:

KHAN, NISAR AHMED y

BENNER, ROBBERT

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 456 333 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

Tratamiento de hemorragia traumática con oligopéptidos cortos.

5 **Campo técnico**

La invención se refiere en líneas generales a biotecnología y medicina.

Antecedentes

10

La lesión es la quinta causa principal de muerte en todo el mundo y se convertirá en la segunda causa principal en 2020. Ya es la causa principal de muerte en individuos con edad entre 5 y 45 años. La lesión de tráfico, la lesión autoinfligida, la violencia interpersonal (incluyendo guerras), lesión relacionada con el trabajo, caídas, quemaduras, y desastres medioambientales contribuyen todos con su aporte.

15

La prevención primaria es el modo más eficaz de limitar las lesiones. La importancia de la educación, los controles técnicos, y el estado de derecho en prevención de lesiones no puede ser sobreestimada. Mueren casi tantos individuos de lesión de tráfico en Egipto como en los Estados Unidos, pero Egipto tiene un cuarto de la población y una décima parte de la cantidad de vehículos. No obstante, la mayoría de las lesiones en ambos países se pueden prevenir.

20

25

La prevención secundaria, la aplicación de cuidados críticos para evitar muerte y discapacidad después de una lesión, también es altamente eficaz. El coste del cuidado de traumatismos es bajo por años de vida ajustados por la calidad en comparación con los tratamientos en otras categorías de enfermedad común tales como enfermedad cardiovascular, apoplejía, o terapia de intervención contra el cáncer. Estos cuidados se proporcionan mejor en centros regionales. Los centros de trauma de Nivel 1 más grandes típicamente observan más de 5000 admisiones directas cada año y cuentan con personal todo el día con cirujanos de trauma, neurocirujanos, ortopedistas, anestesiólogos, y una serie completa de personal de apoyo. El trabajo de estos centros en el cuidado de los pacientes, la educación médica, y el desarrollo de nuevos conocimientos está dirigiendo una revolución internacional en la calidad del cuidado de lesiones.

30

35

Cada año, 1 de cada 7 americanos se lesiona de forma significativa. Dos tercios de estos, o 1 persona de cada 10 de la población de Estados Unidos, busca cuidados médicos para esa lesión, y 1 de cada 100 americanos es admitido en un hospital para cuidados por lesión cada año. Aproximadamente 1 de cada 10 pacientes admitidos por lesión, o 1 de cada 1000 americanos, recibe productos sanguíneos en el transcurso de sus cuidados por lesión. Estos individuos reciben del 10% al 15% de toda la sangre transfundida en los Estados Unidos.

40

La hemorragia severa y choque hemorrágico son causas comunes de morbilidad y mortalidad en pacientes críticamente enfermos en cuidados intensivos. Los pacientes en choque tienen macro y microcirculación alterada en diversos lechos tisulares. La perfusión esplácnica alterada desempeña una tarea importante en el desarrollo de disfunción multiorgánica debido a translocación bacteriana potenciada desde el intestino y activación de una cascada inflamatoria exacerbada. La perfusión esplácnica disminuida también conduce al bajo suministro de sangre a los órganos corriente abajo, tales como el hígado, conduciendo a disfunción hepática, que también contribuye a fallo multiorgánico después del choque.

45

50

Aproximadamente 156.000 personas mueren de lesión cada año en los Estados Unidos, y 93.000 de esas fatalidades implican traumatismo físico. La mitad de estos individuos mueren antes de alcanzar el hospital. Entre aquellos que alcanzan el hospital vivos y que morirán durante la admisión hospitalaria, el 80% muere en las primeras 24 horas después de la admisión. Las causas más frecuentes de muerte de pacientes que mueren en el terreno o en hospital son lesiones neurológica profunda y hemorragia incontrolada.

55

El control de la hemorragia es un aspecto crítico del cuidado de traumatismos. En el terreno, los vendajes, la presión directa, y los torniquetes controlan la hemorragia superficial y de extremidades. En el hospital, las imágenes de diagnóstico y la exploración quirúrgica permiten la rápida identificación de la mayoría de los demás sitios de hemorragia. Sin embargo, la identificación de sitios de lesión no siempre permite el control inmediato de la hemorragia. Lesiones tales como laceraciones hepáticas profundas y fracturas pélvicas con alteración del plexo venoso pélvico frecuentemente requieren taponamiento, y el control de la hemorragia se obtiene solamente de forma lenta. Estas lesiones pueden provocar sangrado extensivo y prolongado incluso en el hospital.

60

65

Los patrones de uso de sangre después de lesión traumática se determinan por los patrones de lesión, la velocidad de transporte a los cuidados quirúrgicos, y la disponibilidad de recursos en el centro quirúrgico. En la University of Maryland R. Adams Cowley Shock Trauma Center en Baltimore durante el año 2000, el 91% de 5649 pacientes admitidos directamente desde la escena de la lesión no recibieron productos sanguíneos. Aproximadamente dos tercios del resto, 332 pacientes, recibieron 10 U de glóbulos rojos (RBC) o menos. Sin embargo, el 75% de los RBC administrados se proporcionaron a los 146 pacientes que recibieron más de 10 U y el 50% de todos los RBC usados se administraron a 68 pacientes, que recibieron más de 20 U de RBC cada uno. Por tanto, un grupo selecto de

pacientes de traumatismo reciben transfusión, y es en estos pacientes que se está cambiando nuestras creencias acerca del uso de sangre y la reanimación y hacia el tratamiento de aquellos a los que está dirigida esta invención.

Los criterios decisivos para la decisión de reanimar o transfundir a un paciente que se sospecha que experimenta hemorragia por traumatismo son diversos y complejos (véase, por ejemplo, Critical Care, Management of Bleeding Following Major Trauma: a European Guideline, Publicado 04/02/2007, Donat R. Spahn; Vladimir Cerny; Timothy J. Coats; Jacques Duranteau; Enrique Fernandez-Mondejar; Giovanni Gordini; Philip F. Stahel; Beverley J. Hunt; Radko Komadina; Edmund Neugebauer; Yves Ozier; Louis Riddez; Arthur Schultz; Jean-Louis Vincent; Rolf Rossaint, http://www.medscape.com/viewarticle/554058_1 y siguientes), sin embargo, en un cierto momento se decide si hay que reanimar y el modo de reanimar proporcionando a dichos pacientes RBC o plasma, plaquetas u otros productos sanguíneos.

Sumario de la invención

En este documento se determina si la administración de oligopéptidos cortos tiene algún efecto sobre los parámetros funcionales inmunes nocivos después de hemorragia por traumatismo.

En este documento se describen métodos y medios asociados para tratar a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano), que está experimentando, está diagnosticado como experimentando, o que se cree que está en riesgo de experimentar choque hemorrágico. Dichos métodos incluyen administrar, al sujeto de un modo médica y farmacéuticamente aceptable, un oligopéptido corto tal como AQGV y/o LQGV. Además de eso, la invención se refiere al uso de al menos un tetrapéptido aislado o sintético seleccionado entre el grupo que consiste en LQGV, AQGV y LAGV y derivados funcionales de los mismos donde un resto L-aminoacídico está sustituido con un D-aminoácido, o una sal de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptable de los mismos, para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que padece o se cree que está padeciendo hemorragia por traumatismo. Dicho péptido preferiblemente se identificó por ensayo de al menos un péptido aislado o sintético en un modelo animal experimental de hemorragia por traumatismo y que demuestra que la administración de dicho péptido de ensayo después de la inducción de hemorragia por traumatismo reduce el nivel plasmático de al menos una citoquina pro-inflamatoria (por ejemplo, TNFalfa o IL-6 según se proporciona en este documento) en un animal sometido a hemorragia por traumatismo en comparación con un animal sometido a hemorragia por traumatismo al que no se ha proporcionado un péptido de ensayo. Dicho péptido consta de cuatro aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en AQGV, LQGV o LAGV. También se proporciona el tratamiento con mezclas de péptidos, que comprenden al menos un péptido seleccionado entre el grupo de AQGV, LQGV o LAGV, y otro péptido. El otro péptido preferido se selecciona entre aquellos capaces de reducir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo animal de hemorragia por traumatismo o choque hemorrágico, tal como uno proporcionado en este documento. En una realización preferida de la invención, dicho tratamiento de hemorragia por traumatismo o choque hemorrágico también comprende proporcionar (reanimar o transfundir) a dichos sujetos sangre o productos sanguíneos tales como glóbulos rojos (RBC), plaquetas, plasma, o combinaciones de los mismos.

También se describe un método para identificar un péptido, o análogo funcional o derivado del mismo, para su uso en la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que padece o se cree que está padeciendo hemorragia por traumatismo que comprende ensayar al menos un péptido aislado o sintético de menos de 30 aminoácidos en un modelo animal experimental de hemorragia por traumatismo y demostrar que la administración de dicho péptido de ensayo después de la inducción de la hemorragia por traumatismo reduce el nivel plasmático de al menos una citoquina pro-inflamatoria en un animal sometido a hemorragia por traumatismo en comparación con un animal sometido a hemorragia por traumatismo al que no se ha proporcionado un péptido de ensayo. Se prefiere ensayar el péptido de ensayo en un método donde a dicho animal sometido a hemorragia por traumatismo también se le proporciona sangre o productos sanguíneos tales como glóbulos rojos (RBC), plaquetas, plasma, o combinaciones de los mismos. También se describe la selección de dicho péptido de ensayo capaz de reducir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias deseados para su uso en la producción de una composición farmacéutica, en particular donde dicha composición farmacéutica se produce para el tratamiento de un sujeto que padece o se cree que está padeciendo hemorragia por traumatismo o choque hemorrágico.

En el choque hemorrágico existe pérdida masiva de sangre, que no puede compensarse por el organismo sin tratamiento. El tratamiento primario de choque hemorrágico es controlar el sangrado y restaurar el volumen intravascular para mejorar la perfusión tisular. Este tratamiento induce una respuesta inflamatoria, que puede culminar en una respuesta inflamatoria severa y finalmente en síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) ^[1,2,3]. Además, aproximadamente el 40% de los pacientes desarrolla sepsis como resultado de hemorragia por traumatismo [3]. La sepsis y el MODS son las causas principales de muerte en pacientes con enfermedad crítica en la unidad de cuidados intensivos en todo el mundo con tasas de mortalidad de aproximadamente el 50% [4,5].

La respuesta inflamatoria severa debida a hemorragia por traumatismo se caracteriza por una expresión aumentada de moléculas de adhesión, tales como la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-1) y la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), en células endoteliales sinusoides y hepatocitos. Además, se hallan niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias de forma sistémica y local en el hígado, los pulmones y el intestino [6, 7, 8, 9]. Las

citoquinas pro-inflamatorias producidas son en particular factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina (IL)-1 β e IL-6 [10, 11, 12]. Estas citoquinas afectan a la integridad/función orgánica directamente, pero también indirectamente a través de mediadores secundarios, tales como óxido nítrico, tromboxanos, leucotrienos, factor activador de plaquetas, prostaglandinas, y el complemento [13, 14]. TNF- α también causa la liberación del factor tisular por células endoteliales conduciendo a deposición de fibrina y coagulación intravascular diseminada [15, 16]. Las células dentro del hígado, principalmente las células de Kupffer, pero también los hepatocitos y las células endoteliales sinusoides, se consideran los productores principales de estas citoquinas pro-inflamatorias durante choque hemorrágico [17].

Un fino equilibrio entre vasodilatadores y vasoconstrictores mantiene la perfusión esplácnica. La producción sistémica aumentada de vasoconstrictores tales como epinefrina, angiotensina II, endotelina, y tromboxano A₂ se ha observado en modelos experimentales de hemorragia por traumatismo y sepsis. Estos vasoconstrictores no solamente contribuyen a la resistencia periférica total aumentada sino también actúan sobre los vasos espláncnicos y reducen su tasa de perfusión. La producción reducida de vasodilatadores o la respuesta atenuada de los vasos espláncnicos a los vasodilatadores (disfunción endotelial) también se observa después de choque hemorrágico severo. Estos dos factores contribuyen a la alteración de la circulación. Además, estos efectos inducen hipoxia intestinal, reducen el suministro de nutrientes, aumentan la producción de radicales libres de oxígeno, y aumentan la acumulación de neutrófilos, conduciendo a daños en la barrera mucosa intestinal y provocando de este modo una translocación bacteriana aumentada.

En la última década, los investigadores se han centrado en la modulación de las respuestas inflamatorias sistémicas con agentes terapéuticos dirigidos a neutralizar la actividad de citoquinas, especialmente TNF- α [18]. Otros investigadores usaron agentes terapéuticos dirigidos a la inhibición de la producción de TNF- α [19]. Sin embargo, la mayoría de estos agentes terapéuticos deben administrarse antes de la aparición del choque hemorrágico para conseguir un efecto terapéutico [19]. Claramente, esto es casi imposible en un entorno clínico de hemorragia por traumatismo. Por lo tanto, las terapias iniciadas después de la aparición de hemorragia por traumatismo severa y dirigidas a reducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias son más relevantes para prevenir los eventos que conducen a MODS.

Durante el embarazo, el sistema inmune materno tolera al feto reduciendo la respuesta inmune mediada por células reteniendo al mismo tiempo la inmunidad humoral normal [20]. Además, los síntomas clínicos de enfermedad autoinmunes mediadas por células remiten en muchos pacientes durante el embarazo [20]. La hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) se secreta principalmente por los sincitiotrofoblastos placentarios durante el embarazo y se ha demostrado que es inmunorreguladora [21, 22, 23]. La subunidad- β de hCG se degrada por enzimas proteolíticas específicas [24]. Esto puede conducir a la liberación de varios oligopéptidos que constan de cuatro a siete aminoácidos que, a causa de su papel en la regulación de los procesos fisiológicos, se consideran reguladores [25]. Se demostró de forma satisfactoria que oligopéptidos sintéticos pueden inhibir la respuesta inflamatoria aguda, la gravedad de la enfermedad y la mortalidad en síndrome de respuesta inflamatoria sistémica inducida por lipopolisacárido de alta dosis [26]. Considerando estos poderosos efectos reguladores de los oligopéptidos sintéticos sobre la inflamación, se hipotetiza que la administración de dichos oligopéptidos reguladores después de hemorragia por traumatismo severo podría inhibir la respuesta inflamatoria masiva, asociada con esta afección. Para este fin, se usó LQGV, que es parte de la estructura primaria del bucle dos de la subunidad- β de hCG, y dos variantes con reemplazo de alanina, concretamente AQGV y LAGV.

En este estudio se demuestra que LQGV, AQGV y LAGV, administrados después de la inducción de choque hemorrágico en ratas, reducían significativamente los niveles de TNF- α e IL-6 en plasma, que está asociado con niveles de transcrito de ARNm de TNF- α e IL-6 reducidos en el hígado. Esto indica que LQGV, AQGV, LAGV tienen potencial terapéutico con efectos beneficiosos sobre la inflamación sistémica, reduciendo de este modo la integridad/función orgánica, que está asociada con choque hemorrágico severo.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1: Modelo de choque hemorrágico (HS) (* = tiempo de administración del péptido A, B o C en los grupos de péptido).

FIG. 2: Presión arterial media en experimento simulado, de choque, y de péptido A, B y C.

FIG. 3: Hematocrito en (de izquierda a derecha) experimentos simulado, de choque, y de péptido A, B y C.

FIG. 4: Leucocitos durante experimentos simulado, de hemorragia por traumatismo, pep A, B y C.

FIG. 5: Macrófagos (MO) y granulocitos (GR) en (de izquierda a derecha) experimentos simulado, de choque hemorrágico por traumatismo, y péptido A, B y C.

FIG. 6: Flujo de sangre arterial en (de izquierda a derecha) experimentos simulado, de choque, y de péptido A, B y C.

FIG. 7: Modelo de choque hemorrágico. A) Representación esquemática del diseño experimental. B) Los mmHg medidos se recalcularon en porcentajes para estandarizar el experimento y para compensar las diferencias en animales. C) Porcentaje de leucocitos en sangre durante diversos momentos puntuales del experimento.

FIG. 8: Niveles plasmáticos de TNF- α en diferentes grupos experimentales determinados a los 15 minutos antes y 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos después de la aparición del choque hemorrágico. □ Simulado, ○ HS, ▽

HS/LQGV, $\diamond$ HS/AQGV, Δ HS/LAGV. Cada figura representa un animal.

FIG. 9: Niveles plasmáticos de IL-6 en diferentes grupos experimentales determinados a los 120, 150 y 180 minutos después de la aparición de choque hemorrágico. $\square$ Simulado, $\circ$ HS, ∇ HS/LQGV, $\diamond$ HS/AQGV, Δ HS/LAGV. Cada figura representa un animal.

FIG. 10: Niveles de transcrito para A) TNF- α , B) IL-6 y C) ICAM-1 en el hígado, 180 minutos después de la aparición de choque hemorrágico. Los datos expresados se correlacionan con la expresión de GAPDH. $\square$ Simulado, $\circ$ HS, ∇ HS/LQGV, $\diamond$ HS/AQGV, Δ HS/LAGV. Cada figura representa un animal.

Descripción detallada de la invención

La patente de Estados Unidos 5.380.668 de Herron (10 de enero de 1995), cuyos contenidos totales se incorporan por esta referencia describe, entre otras cosas, diversos compuestos que tienen la actividad de unión antigénica de hCG. Herron describe adicionalmente medios y métodos para preparar oligopéptidos.

Los compuestos para su uso de acuerdo con la fórmula general pueden prepararse de un modo convencional para dichos compuestos. Para este fin, se activan adecuadamente derivados de aminoácidos N alfa protegidos (y protegidos en la cadena lateral si hay cadenas laterales reactivas presentes) o péptidos y se acoplan a derivados de aminoácidos o péptidos adecuadamente carboxilo protegidos en solución o sobre un soporte sólido. La protección de las funciones alfa-amino generalmente tiene lugar mediante funciones uretano tales como el grupo terc-butiloxycarbonilo inestable en ácido ("Boc"), el grupo benciloxycarbonilo ("Z") y análogos sustituidos o el grupo 9-fluorenil-metiloxycarbonilo inestable en base ("Fmoc"). El grupo Z también puede eliminarse por hidrogenación catalítica. Otros grupos protectores adecuados incluyen Nps, Bmv, Bpoc, Alloc, MSC, etc. Se proporciona una buena visión global de los grupos protectores de amino en *The peptides. Analysis. Synthesis. Biology*, Vol. 3 E. Gross y J. Meienhofer, eds. (Academic Press, Nueva York, 1981). La protección de los grupos carboxilo puede tener lugar por formación de éster, por ejemplo, ésteres inestables en base como metilo o etilo, ésteres inestables en ácido como terc-butilo o, ésteres de bencilo sustituido o de forma hidrogenolítica. La protección de las funciones de cadena lateral como aquellas de lisina y ácido glutámico o aspártico puede tener lugar usando los grupos mencionados anteriormente. La protección de grupos tiol, y aunque no siempre se requiere, de guanidino, alcohol e imidazol puede tener lugar usando una diversidad de reactivos tales como los descritos en *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, *id.* o en *Pure and Applied Chemistry*, 59(3), 331-344 (1987). La activación del grupo carboxilo, de los aminoácidos o péptidos adecuadamente protegidos puede tener lugar por el método de azida, anhídrido mixto, éster activo, o carbodiimida especialmente con la adición de compuestos catalíticos y supresores de racemización 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 pueden usarse los anhídridos de ácidos basados en fósforo. Véase, por ejemplo, *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, *supra* y *Pure and Applied Chemistry*, 59(3), 331-344 (1987).

También es posible preparar los compuestos por el método en fase sólida de Merrifield. Se conocen diferentes soportes sólidos y diferentes, véase, por ejemplo, Barany y Merrifield en *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, 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 que un enlace peptídico se reemplaza por un isómero puede, en general, realizarse usando los grupos protectores y procedimientos de activación previamente descritos. Se describen procedimientos para sintetizar isómeros modificados en la bibliografía, por ejemplo, para el isómero --CH₂-NH-- y para el isómero --CO--CH₂--.

La eliminación de los grupos protectores y, en el caso de síntesis de péptidos en fase sólida, la escisión del soporte sólido, puede tener lugar de diferentes modos, dependiendo de la naturaleza de los grupos protectores y el tipo de enlazador al soporte sólido. Habitualmente la desprotección tiene lugar en condiciones ácidas y en presencia de aceptores. Véanse, por ejemplo, los volúmenes 3, 5 y 9 de la serie en *The Peptides Analysis, Synthesis, Biology*, *supra*.

Otra posibilidad es la aplicación de enzimas en la síntesis de dichos compuestos; para revisiones véase, por ejemplo, H. D. Jakubke en *The Peptides, Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9, S. Udenfriend y J. Meienhofer, eds. (Acad. Press, Nueva York, 1987).

Aunque posiblemente no es deseable desde un punto de vista económico, los oligopéptidos de acuerdo con la invención también podrían prepararse de acuerdo con métodos de ADN recombinante. Dichos métodos implican la preparación del oligopéptido deseado del mismo mediante expresión recombinante de la secuencia o secuencias polinucleotídicas que codifican uno o más de los oligopéptidos en cuestión en un microorganismo adecuado como hospedador. Generalmente el proceso implica introducir en un vehículo de clonación (por ejemplo, un plásmido, ADN fágico, u otra secuencia de ADN capaz de replicarse en una célula hospedadora) una secuencia de ADN que codifica el oligopéptido u oligopéptidos particulares, introducir el vehículo de clonación en una célula hospedadora eucariota o procariota adecuada, y cultivar la célula hospedadora así transformada. Cuando se usa una célula hospedadora eucariota, el compuesto puede incluir una parte glucoproteica.

Como se usa en este documento, un "análogo funcional" o "derivado" de un péptido incluye una secuencia de aminoácidos, u otros monómeros de secuencia, que se ha alterado de modo que las propiedades funcionales de la secuencia son esencialmente iguales en tipo, no necesariamente en cantidad. Un análogo o derivado puede proporcionarse de muchos modos, por ejemplo, a través de "sustitución conservativa de aminoácidos". También pueden diseñarse compuestos peptidomiméticos que se parezcan funcional o estructuralmente al péptido original tomado como el punto de partida pero que están compuestos, por ejemplo, de aminoácidos de origen no natural o poliamidas. Con una "sustitución conservativa de aminoácido", se sustituye un resto de aminoácido con otro resto con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad), de modo que el funcionamiento global probablemente no se vea afectado de forma seria. Sin embargo, a menudo es mucho más deseable mejorar una función específica. También puede proporcionarse un derivado por mejora sistemática de al menos una propiedad deseada de una secuencia de aminoácidos. Esto puede hacerse, por ejemplo, mediante un método de exploración con Ala y/o mapeo neto de remplazo. Con estos métodos, se generan muchos péptidos diferentes, basados en una secuencia de aminoácidos original pero conteniendo cada uno una sustitución de al menos un resto de aminoácido. El resto de aminoácido puede remplazarse por alanina (exploración con Ala) o por cualquier otro resto de aminoácido (mapeo neto de remplazo). De este modo se sintetizan muchas variantes posicionales de la secuencia original de aminoácidos. Cada variante posicional se explora para una actividad específica. Los datos generados se usan para diseñar derivados peptídicos mejorados de una cierta secuencia de aminoácidos.

Un derivado o análogo también puede generarse, por ejemplo, por sustitución de un resto de L-aminoácido con un resto de D-aminoácido. Esta sustitución, que conduce a un péptido que no existe de forma natural en la naturaleza, puede mejorar una propiedad de una secuencia de aminoácidos. Es, por ejemplo, útil para proporcionar una secuencia peptídica de actividad conocida toda de D-aminoácidos en formato de retro inversión, permitiendo de este modo retener la actividad y valores aumentados de semi-vida. Generando muchas variantes posicionales de una secuencia original de aminoácidos y explorando para una actividad específica, pueden diseñarse derivados peptídicos mejorados que comprenden dichos D-aminoácidos con características mejoradas adicionales.

Un especialista en la técnica será capaz de generar compuestos análogos de una secuencia de aminoácidos. Esto puede hacerse, por ejemplo, a través de exploración de una biblioteca de péptidos. Dicho análogo tiene esencialmente las mismas propiedades funcionales de la secuencia en tipo, no necesariamente en cantidad. Además, los péptidos o análogos puede circularizarse, por ejemplo, proporcionándoles cisteínas (terminales), dimerizándolos o multimerizándolos, por ejemplo, por enlace a lisina o cisteína u otros compuestos con cadenas laterales que permitan unión o multimerización, ponerse en configuración en tándem o repetida, conjugarse o unirse de otro modo a vehículos conocidos en la técnica, aunque sólo sea un enlace inestable que permita disociación.

Como se usa en este documento, un oligopéptido también incluye, por ejemplo, una sal aceptable, base, o éster del oligopéptido o un oligopéptido marcado. Como se usa en este documento, "sal aceptable" se refiere a sales que retienen la actividad deseada del oligopéptido o compuesto equivalente, pero preferiblemente no afectan de forma perjudicial a la actividad del oligopéptido u otro componente de un sistema en que usa 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 pueden formarse 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 pamoico, ácido alginico, ácido poliglútamico, y similares. Las sales pueden formarse con cationes de metales 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).

El oligopéptido, o su modificación o derivado, puede administrarse como la entidad, tal cual, o como una sal de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptable, formada por 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 reacción con una base inorgánica (tal como hidróxido sódico, hidróxido de amonio, hidróxido potásico); o con una base orgánica (tal como mono-, di-, trialkil y aril aminas y etanolaminas sustituidas). Un péptido seleccionado y cualquiera de las entidades derivadas también pueden conjugarse con azúcares, lípidos, otros polipéptidos, ácidos nucleicos y PNA; y funcionar in-situ como un conjugado o liberarse de forma local después de alcanzar un tejido u órgano diana.

Una composición farmacéutica para su uso en este documento puede administrarse al sujeto por vía parenteral u oral. Dicha composición farmacéutica puede constar esencialmente de (o constar de) oligopéptido y PBS. Se prefiere que el oligopéptido sea de origen sintético. El tratamiento adecuado, por ejemplo, implica administrar el oligopéptido (o sal o éster) en la composición farmacéutica al paciente por vía intravenosa en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 35 mg/kg de masa corporal del sujeto. Puede ser útil que la composición farmacéutica conste esencialmente de de uno a tres oligopéptidos diferentes.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Materiales y métodos

10 Se usaron ratas Wistar macho adultas libres de patógeno específico (Harlan CPB, Zeist, Países Bajos), que pesaban 350-400 g después de un periodo de aclimatación mínimo de siete días. Los animales se alojaron en condiciones de aislamiento y se mantuvieron a 25°C con un ciclo de luz/oscuridad de doce horas. A las ratas se les permitió acceso libre al agua y el pienso (-). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los Principles of Laboratory Animal Care (publicación NIH N° 86-23, revisada en 1985) bajo un protocolo aprobado por el Committee on Animal Research of the Erasmus University (protocolo EUR 365).

15 Las ratas se tuvieron en ayunas durante una noche pero se les permitió libre acceso al agua antes del experimento. Después de intubación endotraqueal, a las ratas se les ventiló mecánicamente con una mezcla de isoflurano (-) N₂O/O₂ a 60 respiraciones/minuto. La temperatura corporal se mantuvo continuamente a 37,5°C colocando a los animales en una "semi-cubeta" termocontrolada (UNO, Países Bajos). Se lavaron abundantemente tubos de polietileno (PE-50, Becton Dickinson; St. Michielsgestel, Países Bajos) con heparina y se colocaron a través de la arteria carótida derecha en la aorta y en la vena yugular interna derecha. Los animales no recibieron heparina antes o durante el experimento.

25 Se midieron las presiones arteriales medias (MAP) usando transductores (Becton Dickinson) que se conectaron en línea a un registrador electrónico (Hewlett Packard, 78354-A Alemania) para calcular electrónicamente las presiones medias y para la medición continua de la presión sanguínea del animal. En condiciones semi-estériles se realizó una laparotomía media y se colocaron sondas ultrasónicas de flujo perivascular (Transonic Systems Inc, Maastricht, Países Bajos) en la arteria hepática común y la vena porta. Se colocó un catéter supra púbico para controlar la producción de orina durante y después de la reanimación.

30 Después de un periodo de aclimatación de 20 minutos, las ratas se asignaron aleatoriamente en los siguientes cinco grupos:

35 El grupo de choque hemorrágico se exanguinó en diez minutos hasta una presión arterial media (MAP) de 40 mmHg y se mantuvo a este nivel durante 60 minutos extrayendo o re-infundiendo sangre derramada según lo necesario. Después de ello, se reanimó a los animales con más o menos cuatro veces el volumen de la sangre extraída durante 30 minutos con una solución de NaCl al 0,9%.

40 El grupo de choque hemorrágico + péptido A (LAGV; código de aminoácidos de una letra) experimentó el mismo procedimiento que el grupo de choque hemorrágico pero recibió una única inyección en embolada de 5 mg/kg de péptido A por vía intravenosa 30 minutos después de la inducción del choque.

El grupo de choque hemorrágico + péptido B (AQGV) experimentó el mismo procedimiento que el grupo de choque hemorrágico y recibió una única inyección en embolada de 5 mg/kg de péptido B por vía intravenosa, 30 minutos después de la inducción del choque.

45 El grupo de choque hemorrágico + péptido C (LQGV) experimentó el mismo procedimiento que el grupo de choque hemorrágico y recibió una única inyección en embolada de 5 mg/kg de péptido C por vía intravenosa, 30 minutos después de la inducción del choque.

50 El grupo simulado experimentó el mismo procedimiento que el grupo de choque hemorrágico sin realizar la hemorragia o la administración de ningún tipo de péptido.

55 El flujo sanguíneo arterial hepático (QHA) y el flujo sanguíneo venoso de la porta hepática (QVP) se midieron con sondas ultrasónicas de flujo perivascular en tiempo transitorio, conectadas a un medidor de ultrasonidos (T201; Transonic Systems, Inc., Maastricht, NL). La hemodinámica sistémica y hepática se midieron de forma continua. En momentos puntuales regulares se tomaron muestras de sangre arterial. Los animales se sacrificaron extrayendo la sangre arterial mediante la arteria carótida.

Procedimiento de recogida de sangre, tejido, y células

60 *Recogida y almacenamiento de plasma:* Se obtuvo sangre arterial completa a -15, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos después de la inducción del choque a través de la arteria carótida derecha y se recogió por duplicado. Se colocaron 0,2 ml en tubos (Eppendorf EDTA KE/1,3) para ensayarse en el contador coulter (-). Se colocaron 0,5 ml en tubos Minicollect (Bio-ona, Greiner), se centrifugaron durante cinco minutos, se congelaron inmediatamente, y se almacenaron a -80°C, hasta que se ensayaron. Todos los ensayos se corrigieron para el hematocrito.

65

Medición de citoquinas (aún en progreso): Los niveles de IL-6, e IL-10 en el suero se determinaron mediante un ELISA (R&D Systems Europe Ltd) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Histología (aún en progreso): Se examinaron las alteraciones en la morfología del pulmón, el hígado, el intestino sigmoideo y delgado en animales con operación simulada, en animales después de hemorragia por traumatismo y en animales después de hemorragia por traumatismo tratados con péptido A, B o C. Todos los tejidos se recogieron por duplicado. Una parte se recogió y fijó en formalina (Sigma) y después de embebió en parafina. La otra parte se colocó en tubos (viales NUNC Cryo tube™), se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta ensayarse.

Resultados

Presión arterial media: La MAP bajó en todos los grupos de choque significativamente durante la fase de choque en comparación con el grupo de control.

Hematocrito: El hematocrito después de la hemorragia por traumatismo fue similar en los diferentes grupos tratados y no tratados con péptido A, B y C. Durante la fase de choque hubo una diferencia de hematocrito en el grupo de control en comparación con los otros grupos. A partir de la fase de reanimación (90 minutos) no hubo diferencias significativas en el hematocrito entre los grupos de control, hemorragia por traumatismo, y péptido.

Reclutamiento de leucocitos: Durante la hemorragia por traumatismo, los leucocitos bajaron desde el 100% en T0 en todos los grupos hasta un mínimo del $40,0 \pm 11,9\%$, $42,0 \pm 8,7\%$, $47,3 \pm 12,4\%$, $38,2 \pm 7,4\%$ respectivamente en el grupo no tratado, tratado con péptido A, tratado con péptido B y tratado con péptido C a causa de la acumulación de leucocitos en la microcirculación esplácnica. No hubo diferencias significativas en la concentración de leucocitos entre todos los grupos de hemorragia por traumatismo tratados y no tratados, y el grupo de control durante la fase de choque. No se apreció diferencia significativa entre los animales tratados con péptido A, B o C y los animales no tratados.

Concentraciones sanguíneas de macrófagos y granulocitos: En 180 min. después del inicio de la hemorragia por traumatismo, las concentraciones de macrófagos (M_0) y granulocitos en circulación fueron significativamente inferiores en los animales tratados con péptido B y C en comparación con el grupo experimental correspondiente. Los niveles sanguíneos de M_0 y granulocitos en circulación fueron de $5,556 \pm 1,698 \cdot 10^9/l$ en animales de operación simulada mientras que los niveles sanguíneos fueron de $6,329 \pm 1,965 \cdot 10^9/l$ después de la hemorragia por traumatismo, y disminuyeron en un 29,9% después de la administración de péptido B ($4,432 \pm 0,736 \cdot 10^9/l$) y un 39,2% después de la administración de péptido C ($3,846 \pm 0,636 \cdot 10^9/l$) en comparación con las concentraciones después de la hemorragia por traumatismo.

Flujo sanguíneo hepático arterial: Hubo una disminución en el flujo sanguíneo hepático arterial en el grupo de choque ($18,3 \pm 14,3\%$) y en el grupo de péptido A ($21,3 \pm 9,1\%$), B ($18,1 \pm 9,0\%$) y C ($21,2 \pm 8,6\%$) durante el periodo de choque en comparación con el grupo de control ($102,6 \pm 23,5\%$). Se observó un aumento en el flujo de sangre durante la reperusión en la arteria hepática del grupo de choque ($128,9 \pm 75,4\%$) en comparación con animales de control ($83,7 \pm 24,2\%$) y los animales tratados con péptido B ($78,4 \pm 28,3\%$).

La hemorragia por traumatismo provoca estrés hipóxico que debido a la reducción absoluta en el volumen de sangre en circulación. En contraste, la sepsis es un estado inflamatorio mediado principalmente por productos bacterianos. Es interesante que estas amenazas divergentes manifiesten alteraciones patofisiológicas similares en términos de la circulación esplácnica.

El choque hemorrágico aumenta significativamente la acumulación de leucocitos en la microcirculación esplácnica debido a la regulación positiva de selectina P. La expresión de la molécula de adhesión intercelular dentro de la vasculatura muscular intestinal después del choque hemorrágico promueve el reclutamiento local de leucocitos, y esta respuesta inflamatoria está acompañada por la posterior alteración de la función intestinal.

La adhesión y extravasación de neutrófilos no solamente contribuyen a la respuesta inflamatoria response en el lecho tisular esplácnico sino que también inducen fallo microcirculatorio intestinal y disfunción después de estrés severo. Esto está mediado por la expresión inducida de moléculas de adhesión, tales como selectinas y moléculas de adhesión celular endotelial, sobre la superficie de neutrófilos y células endoteliales.

En estos experimentos de choque, la concentración de leucocitos disminuye significativamente durante el choque hemorrágico en comparación con los animales de control. Sin embargo, una única dosis de péptido B o C administrado durante la reanimación, disminuía las concentraciones de macrófagos y granulocitos en circulación 120 minutos después del inicio del choque hemorrágico en comparación con los animales no tratados.

Como algunas hormonas sexuales femeninas protegen de forma eficaz los órganos del fallo circulatorio después de diversas afecciones circulatorias adversas, se han realizado numerosos estudios para aclarar el mecanismo molecular de, por ejemplo, la acción del estradiol con respecto a la circulación tisular. En este estudio, se administró

una única dosis de péptido después de hemorragia por traumatismo y se midieron diversos parámetros a las 3 horas después de la inducción del choque. El tratamiento con péptidos mejoró o restauró los parámetros funcionales inmunes y las funciones cardiovasculares. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la administración de oligopéptidos cortos (NMPF) es beneficiosa en el tratamiento de víctimas de traumatismo críticamente enfermas que experimentan choque hemorrágico.

Ejemplo 2

ANTECEDENTES: El choque hemorrágico seguido de reanimación induce una respuesta pro-inflamatoria masiva, que puede culminar en síndrome de respuesta inflamatoria severa, fallo multiorgánico y finalmente muerte. Los tratamientos dirigidos a inhibir los efectos de las citoquinas pro-inflamatorias son solamente eficaces cuando se inician antes del inicio del choque hemorrágico, lo que limita mucho su aplicación clínica.

OBJETIVO: Investigamos si la administración de oligopéptidos sintéticos (LQGV, AQGV, LAGV) 30 minutos después de la inducción del choque hemorrágico reducía la respuesta inflamatoria.

MÉTODOS: Se exanguinó a las ratas al 50% de la presión arterial media basal y una hora después se reanimaron por transfusión de sangre autóloga. Treinta minutos después del inicio del choque hemorrágico, los grupos experimentales recibieron uno de los oligopéptidos sintéticos (LQGV, AQGV, LAGV) o solución de NaCl al 0,9%. Se determinaron los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6 en momentos puntuales fijos antes y después del inicio del choque hemorrágico. Se determinaron los niveles de ARNm en hígado, pulmones, íleo y sigmoideo para TNF- α , IL-6 e ICAM-1 180 minutos después del inicio de la hemorragia.

RESULTADOS: El tratamiento con uno de los tres oligopéptidos (LQGV, AQGV, LAGV) redujo de forma eficaz los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6 así como los niveles de transcrito de ARNm de TNF- α e IL-6 en el hígado.

CONCLUSIÓN: Considerando estos poderosos efectos de los oligopéptidos durante choque hemorrágico severo, pueden tener potencial terapéutico con efectos beneficiosos sobre hiper-inflamación, reduciendo de este modo el daño tardío en tejidos y órganos potencialmente mortal que está asociado con choque hemorrágico severo.

INTRODUCCIÓN: En choque hemorrágico existe una pérdida masiva de sangre, que no puede compensarse por el organismo sin tratamiento. El tratamiento primario del choque hemorrágico es controlar el sangrado y restaurar el volumen intravascular para mejorar la perfusión tisular. Este tratamiento induce una respuesta inflamatoria, que puede culminar en una respuesta inflamatoria severa y finalmente en síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) [1,2,3]. Además, aproximadamente el 40% de los pacientes desarrolla sepsis como resultado de hemorragia por traumatismo [3]. La sepsis y el MODS son las causas principales de muerte en pacientes críticamente enfermos en la unidad de cuidados intensivos en el mundo con tasas de mortalidad de aproximadamente el 50% [4,5].

La respuesta inflamatoria severa debida a hemorragia por traumatismo se caracteriza por una expresión aumentada de moléculas de adhesión, tales como la molécula-1 de adhesión intracelular (ICAM-1) y la molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), en las células endoteliales sinusoides y los hepatocitos. Además, se encuentran niveles aumentados de citoquinas pro-inflamatorias de forma sistémica y local en hígado, pulmones e intestino [6,7,8,9]. Las citoquinas pro-inflamatorias producidas son, en particular, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina (IL)-1 β e IL-6 [10,11,12]. Estas citoquinas afectan a la integridad/función de los órganos directamente, pero también indirectamente a través de mediadores secundarios, tales como óxido nítrico, tromboxanos, leucotrienos, factor activador de plaquetas, prostaglandinas, y el complemento [13,14]. El TNF- α también causa la liberación del factor tisular por células endoteliales, lo que conduce a deposición de fibrina y coagulación intravascular diseminada [15,16]. Las células dentro del hígado, principalmente las células de Kupffer, pero también los hepatocitos y las células endoteliales sinusoides, se consideran los productores principales de estas citoquinas pro-inflamatorias durante el choque hemorrágico [17].

En la última década, los investigadores se han centrado en la modulación de las respuestas inflamatorias sistémicas con agentes terapéuticos dirigidos a neutralizar la actividad de citoquinas, especialmente TNF- α [18]. Otros investigadores usaron agentes terapéuticos dirigidos a la inhibición de la producción de TNF- α [19]. Sin embargo, la mayoría de estos agentes terapéuticos debe administrarse antes del inicio del choque hemorrágico para conseguir un efecto terapéutico [19]. Claramente, esto es casi imposible en un entorno clínico de hemorragia por traumatismo. Por lo tanto, las terapias iniciadas después de la aparición de la hemorragia severa por traumatismo y dirigidas a reducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias son más relevantes para prevenir los eventos que conducen a MODS.

Durante el embarazo, el sistema inmune materno tolera al feto reduciendo la respuesta inmune mediada por células reteniendo al mismo tiempo la inmunidad humoral normal [20]. Además, remiten los síntomas clínicos de enfermedades autoinmunes mediadas por células en muchas pacientes durante el embarazo [20]. La hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) se secreta principalmente por sincitiotrofoblastos placentarios durante el embarazo y ha demostrado ser inmuno-reguladora [21,22,23]. La subunidad β de hCG se degrada por enzimas

proteolíticas específicas ^[24]. Esto puede conducir a la liberación de varios oligopéptidos que constan de cuatro a siete aminoácidos que, a causa de su papel en la regulación de procesos fisiológicos, se consideran reguladores ^[25]. Demostramos satisfactoriamente que oligopéptidos sintéticos pueden inhibir la respuesta inflamatoria aguda, la gravedad de la enfermedad, y la mortalidad en síndrome de respuesta inflamatoria sistémica inducida por elevada dosis de lipopolisacárido ^[26]. Considerando estos poderosos efectos reguladores de los oligopéptidos sintéticos sobre la inflamación, hipotetizamos que la administración de dichos oligopéptidos reguladores después de hemorragia severa por traumatismo podría inhibir la respuesta inflamatoria masiva, asociada con esta afección. Para este fin, usamos LQGV, que es parte de la estructura primaria del bucle dos de la subunidad β de hCG, y dos variantes de remplazo con alanina, concretamente AQGV y LAGV.

En este estudio demostramos que LQGV, AQGV y LAGV, administrados después de la inducción de choque hemorrágico en ratas, reducían significativamente los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6, que están asociados con niveles reducidos de transcrito de ARNm de TNF- α e IL-6 en el hígado. Esto indica que LQGV, AQGV, LAGV pueden tener potencial terapéutico con efectos beneficiosos sobre la inflamación sistémica, reduciendo de este modo la integridad/función de los órganos, que está asociada con choque hemorrágico severo.

Materiales y métodos

Animales

Se usaron ratas Wistar macho adultas libres de patógeno específico (*Harlan CPB, Zeist, Países Bajos*), que pesaban 350-400 g. Los animales se alojaron en condiciones de aislamiento a 25°C con un ciclo de luz/oscuridad de doce horas, y se les dejó pienso y agua *ad libitum*. El protocolo experimental se aprobó por el Animal Experiment Committee under the Dutch Experiments on Animals Act y estaba adherido a las normas impuestas en esta legislación nacional que cumple la implementación de las "Guidelines on the protection of experimental animals" por el Consejo de Europa (1986), Directiva 86/609/EC.

Oligopéptidos sintéticos: Los oligopéptidos (LQGV, AQGV y LAGV) se sintetizaron por Ansynth Service B.V. (*Roosendaal, Países Bajos*) y se disolvieron en NaCl al 0,9% a una concentración de 10 mg/ml.

Procedimientos quirúrgicos: Se privó a las ratas de pienso durante una noche antes del experimento, pero se les dejó agua *ad libitum*. Se anestesió a las ratas usando una mezcla de N₂O/O₂ isoflurano (*Pharmachemie B.V., Haarlem, Países Bajos*). La temperatura corporal se mantuvo continuamente a 37,5°C colocando a las ratas en una 'semi-cubeta' termocontrolada (*UNO, Rotterdam, Países Bajos*). Se realizó entubación endotraqueal, y las ratas se ventilaban a 60 respiraciones por minuto con una mezcla de N₂O/O₂ isoflurano al 2%. Se lavaron abundantemente tubos de polietileno (*PE-50, Becton Dickinson; St. Michielsgestel, Países Bajos*) con heparina y se colocaron a través de la arteria carótida derecha en la aorta y en la vena yugular interna derecha. Las ratas no recibieron heparina antes o durante el experimento.

Procedimientos experimentales: Después de un periodo de aclimatación de 15 minutos, las ratas se asignaron aleatoriamente en cinco grupos diferentes: 1) simulado, 2) choque hemorrágico (HS), 3) choque hemorrágico con tratamiento con LQGV (HS/LQGV), 4) choque hemorrágico con tratamiento con AQGV (HS/AQGV) y 5) choque hemorrágico con tratamiento con LAGV (HS/LAGV). El choque hemorrágico se indujo por extracción de sangre, reduciendo el volumen de sangre en circulación hasta que alcanzó una presión arterial media (MAP) del 50% de los mmHg normales. Este nivel de hipotensión se mantuvo durante 60 minutos. Después de 30 minutos, las ratas recibieron una única inyección en embolada de 10 mg/kg de LQGV, AQGV, LAGV o solución de NaCl al 0,9%. Los péptidos y las dosificaciones se basaron en estudios previos, en que se realizaron experimentos de escala de dosis (manuscrito en preparación). Sesenta minutos después de la inducción del choque hemorrágico, se reanimó a las ratas por transfusión de sangre autóloga durante un periodo de 30 minutos y se controlaron durante otros 120 minutos después de lo cual se sacrificaron (Fig.7A). Los animales simulados experimentaron el mismo procedimiento quirúrgico que los animales de choque hemorrágico, pero sin realizar la hemorragia y la administración de péptidos.

Recogida y almacenamiento de plasma: Se obtuvo sangre arterial 15 minutos antes y 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos después del inicio de la hemorragia (Fig. 7A). Después de la extracción de sangre, se determinaron las cantidades de leucocitos usando un contador coulter (*Beckman Coulter, Mijdrecht, Países Bajos*) y se corrigieron para el hematocrito. Se colocaron aproximadamente 0,3 ml de sangre en tubos mini collect (*Greiner, Bio-one, Alphen a/d Rijn, Países Bajos*), se obtuvo el plasma por centrifugación (1500 r.p.m.; 5 minutos), se congeló inmediatamente, y se almacenó a -80°C, hasta ensayarse.

Mediciones de la presión arterial media: Durante los experimentos, se midió continuamente la presión arterial media (MAP) usando transductores (*Becton Dickinson*) que estaban conectados en línea a un registrador electrónico (*Hewlett Packard, 78354-A, Alemania*).

Recogida almacenamiento de tejido: Se retiraron quirúrgicamente el hígado, los pulmones, el íleo y el sigmoideo al final del experimento, se congelaron instantáneamente, y se almacenaron a -80°C, hasta ensayarse.

Medición de citoquinas: Se determinaron los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6 por ELISA (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, RU), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Evaluación de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa a tiempo real (RQ): Se aisló el ARN usando un kit QIAGEN (QIAGEN, Hidden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinaron los transcritos de TNF- α , IL-6 e ICAM-1 por RQ-PCR usando una máquina de PCR Applied Biosystems 7700 (Foster City, CA, EEUU) como se ha descrito previamente^[27]. Se cuantificó la expresión de TNF- α , IL-6 e ICAM-1 por normalización frente a GAPDH. Las combinaciones de sondas de cebador usadas se enumeran en la Tabla 1.

Análisis estadístico: El análisis estadístico se realizó usando el software SPSS versión 11 (SPSS Inc., Chicago, III). Las diferentes entre grupos se analizaron con el ensayo estadístico de Kruskal-Wallis. Si el ensayo estadístico de Kruskal-Wallis daba un resultado de $p < 0,05$, se realizaba un ensayo de comparación múltiple de Dunn y $p < 0,05$ se consideraba estadísticamente significativo.

Resultados

Inducción de choque hemorrágico: Disminuir la MAP al 50% del normal inducía choque hemorrágico, que se mantuvo satisfactoriamente durante 60 minutos en los cuatro grupos experimentales (Fig. 7B). No se observaron cambios en la MAP en las ratas de tratamiento simulado (Fig. 7B). Se observó una disminución en el porcentaje de leucocitos sanguíneos en los cuatro grupos experimentales después de la extracción de sangre (Fig. 7C). Sesenta minutos después del choque hemorrágico, las ratas se reanimaron con su propia sangre para inducir reperusión orgánica, que estaba asociada con una normalización del nivel de leucocitos (Fig. 7C).

El tratamiento con oligopéptido reduce los niveles de citoquinas pro-inflamatorias: Se evaluó la capacidad terapéutica de tres oligopéptidos sintéticos (LQGV, AQGV, LAGV) relacionados con la estructura primaria del bucle dos de la subunidad β de hCG en un modelo de rata de choque hemorrágico. Antes de la inducción de la hemorragia, los niveles plasmáticos de TNF- α eran comparable en los cinco grupos (~15-24 pg/ml) (Fig. 8). En el grupo HS, los niveles de TNF- α comenzaron a aumentar treinta minutos después de la inducción del choque hemorrágico y aumentaron significativamente después de sesenta minutos, en comparación con el grupo simulado (264 pg/ml frente a 24 pg/ml, respectivamente; $p < 0,01$). Los niveles de TNF- α alcanzaron un máximo de 374 pg/ml después de 90 minutos en el grupo HS, después de lo cual los niveles disminuyeron de nuevo pero siempre permaneciendo aumentados en comparación con el grupo simulado (Fig. 8). En contraste, ninguno de los grupos HS tratados con oligopéptido (HS/LQGV, HS/AQGV, HS/LAGV) mostró un aumento en los niveles plasmáticos de TNF- α durante el experimento (Fig. 8). Se sabe que los niveles de IL-6 aumentan en un momento posterior que TNF- α después de choque hemorrágico severo^[11,12]. Por lo tanto, se determinaron los niveles de IL-6 en muestras de sangre recogidas 120, 150 y 180 minutos después del inicio del choque hemorrágico. En el grupo HS, los niveles plasmáticos de IL-6 estaban significativamente aumentados en comparación con el grupo simulado a los 120 minutos (1704 pg/ml frente a 338 pg/ml, respectivamente; $p < 0,001$), a los 150 minutos (2406 pg/ml frente a 316 pg/ml, respectivamente; $p < 0,001$) y a los 180 minutos (2932 pg/ml frente a 369 pg/ml, respectivamente; $p < 0,001$) (Fig. 9). Aunque los niveles de IL-6 tendían a aumentar un poco en las ratas HS/tratadas con oligopéptido en comparación con las ratas de tratamiento simulado, estos nunca alcanzaron significancia. El tratamiento con oligopéptidos después de choque hemorrágico (HS/LQGV, HS/AQGV, HS/LAGV) provocó una reducción significativa de los niveles plasmáticos de IL-6 en comparación con el grupo de choque hemorrágico no tratado (HS) (Fig. 9). Estos datos demuestran que el tratamiento con una única dosis de LAGV, AQGV, o LAGV después de la inducción de choque hemorrágico provoca una reducción significativa de los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6.

El tratamiento con oligopéptido reduce los niveles de ARNm de TNF- α e IL-6 pero no de ICAM-1 en el hígado: Como el tratamiento con oligopéptido disminuye claramente los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6, se analizaron los niveles de ARNm en tejido de hígado, pulmones, íleo y sigmoideo a los 180 minutos después del inicio del choque hemorrágico. En el hígado, los transcritos de TNF- α aumentaban significativamente en el grupo HS en comparación con el grupo simulado. El tratamiento con oligopéptido estaba asociado con disminución en los transcritos de TNF- α en el hígado en comparación con ratas HS no tratadas mostrando solamente HS/LQGV una reducción significativa en comparación con HS ($p < 0,01$; Fig. 10A).

En el grupo HS, los transcritos de IL-6 en el hígado se aumentaron en ~83 veces en comparación con el grupo simulado ($p < 0,001$; Fig. 10B). Ninguno de los grupos tratados con oligopéptido mostró un aumento en el ARNm de IL-6 en comparación con el grupo de tratamiento simulado. El tratamiento con LQGV y AQGV provocó una reducción significativa en los transcritos de ARNm de IL-6 en comparación con el grupo HS ($p < 0,05$; Fig. 10B).

Los niveles de transcrito de ICAM-1 en el hígado aumentaron significativamente en el grupo HS en comparación con el grupo simulado (Fig. 10C). El tratamiento con oligopéptido durante el choque hemorrágico (HS/LQGV, HS/AQGV, HS/LAGV) no afectaba a los niveles de transcrito de ICAM-1 en el hígado (Fig. 10C). En tejido de pulmones, íleo y sigmoideo no pudieron observarse diferencias significativas entre los diversos grupos para TNF- α , IL-6 e ICAM-1 (datos no mostrados). Estos datos indican que el tratamiento con oligopéptido después de choque hemorrágico disminuye los niveles de transcrito de citoquinas pro-inflamatorias en el hígado pero no reduce los niveles de

transcrito de ICAM-1.

Discusión

5 En este estudio usamos un modelo de rata de choque hemorrágico y demostramos que la administración de oligopéptidos sintéticos (LQGV, AQGV, LAGV) 30 minutos después de la inducción del choque, reduce de forma eficaz los niveles de citoquinas pro-inflamatorias asociados con esta afección. Nuestros datos demuestran que es una consecuencia probable de la expresión reducida de niveles de transcrito de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias en el hígado.

10 El choque hemorrágico está asociado con una adherencia temprana de leucocitos al endotelio vascular como resultado de un volumen disminuido de sangre ^[28]. En nuestro modelo se detectó una disminución en el porcentaje de leucocitos en los cuatro grupos experimentales después de la extracción de sangre. Esto indica que todos los grupos experimentales experimentaron choque inducido por hemorragia. La reanimación provocó un aumento en los porcentajes de leucocitos en los grupos experimentales.

15 El choque hemorrágico seguido de reanimación induce una respuesta inflamatoria severa, que se caracteriza por una producción exagerada de citoquinas pro-inflamatorias tempranas, tales como TNF- α , IL1 β , y posteriormente IL-6 ^[10,11,12]. El TNF- α es un mediador clave del sistema inmune innato que es crucial para la generación de una respuesta inmune protectora local contra agentes infecciosos o no infecciosos ^[9]. Sin embargo, la producción masiva e incontrolada de TNF- α es letal, ya que se propaga por el torrente sanguíneo a otros órganos induciendo de este modo daño tisular y promoviendo la producción de mediadores pro-inflamatorios secundarios, tales como IL6 ^[10].

25 A pesar de la mejora en las estrategias de tratamiento, los pacientes de hemorragia por traumatismo aún pueden desarrollar respuesta inflamatoria severa que conduce a MODS y finalmente muerte. Las estrategias de tratamiento experimental dirigidas a neutralizar citoquinas bioactivas, tales como anticuerpos monoclonales contra TNF- α , se han aplicado satisfactoriamente en varios trastornos inflamatorios, incluyendo enfermedad de Crohn y artritis reumatoide ^[29,30]. Sin embargo, estudios clínicos que usaban anticuerpos monoclonales contra TNF- α no mostraron efecto clínico en pacientes de traumatismo ^[31]. Se ha sugerido que los anticuerpos neutralizantes de TNF- α causan la acumulación de una gran combinación de TNF- α /anti-TNF- α , que actúa como un depósito de liberación lenta que puede conducir a un aumento de TNF- α activo constante ^[32]. Por lo tanto, puede ser más beneficioso apuntar a terapias que disminuyan la producción de TNF- α e IL-6 para limitar el daño tisular y las tasas de mortalidad en pacientes de hemorragia por traumatismo que la neutralizar las citoquinas ya producidas.

35 En choque hemorrágico, se secreta TNF- α en minutos después de la estimulación celular, aunque la producción se detiene después de tres horas, y los niveles plasmáticos de TNF- α se vuelven casi indetectables ^[9]. Demostramos que los oligopéptidos reguladores (LQGV, AQGV, LAGV), administrados 30 minutos después de la inducción de choque hemorrágico, reducían significativamente los niveles plasmáticos de TNF- α e IL-6. Que el efecto sobre la producción de IL-6 sea directo, o indirecto debido a los reducidos niveles plasmáticos de TNF- α no puede concluirse a partir de nuestros datos. No obstante, establecer una reducción de IL-6 es de importancia clínica, porque elevados niveles plasmáticos de IL-6 se correlacionan con un mal resultado y una supervivencia disminuida en pacientes con traumatismo severo e infección ^[33,34]. Las células dentro del hígado se consideran los productores principales de citoquinas pro-inflamatorias durante el choque hemorrágico ^[17]. Los niveles de transcrito de TNF- α e IL-6 estaban significativamente aumentados en los hígados del grupo HS. El tratamiento con LQGV, AQGV o LAGV se asoció con una reducción en los transcritos de TNF- α e IL-6 en hígado, lo que puede ser indicativo de una activación transcripcional disminuida. Otra característica importante de las células endoteliales y los hepatocitos durante el choque hemorrágico es la expresión aumentada de la molécula de adhesión ICAM-1 ^[7,8]. Nuestro estudio confirma la expresión aumentada de ICAM-1 en el hígado después de choque hemorrágico. Sin embargo, el tratamiento con LQGV, AQGV, o LAGV no provocaba reducción en la expresión de ICAM-1. Esto podría deberse a la incapacidad de los oligopéptidos de impedir la inducción de la transcripción de ICAM-1. En pulmones, íleo y sigmoideo, no detectamos efectos del choque hemorrágico sobre la inducción de transcritos de TNF- α , IL-6 e ICAM-1. Esto confirma que el hígado es el primer órgano en que se inicia la respuesta inflamatoria después de choque hemorrágico y reanimación con fluido ^[15,31,32].

55 En la bibliografía está bien descrito que hCG puede regular el sistema inmune, a causa de su papel putativo en la prevención del rechazo del aloinjerto fetal durante el embarazo ^[35,36]. La CG humana ejerce su función uniéndose a receptores unidos a membrana específicos, que activan mensajeros secundarios ^[37]. Se espera que los oligopéptidos crucen las membranas celulares sin requerir receptores unidos a membrana ^[38] y ejerzan sus efectos de forma intracelular. Este estudio y estudios en curso en nuestro laboratorio demuestran que estos oligopéptidos tienen un efecto regulador distinto sobre la expresión de genes implicados en las vías inflamatorias y la inmunidad. No obstante, es necesaria investigación sobre el mecanismo de acción de los péptidos relacionados con hCG que regulan la expresión génica.

65 Recientemente se publicó un estudio en que el dipéptido AG inhibía la expresión de ARNm de citoquinas pro-inflamatorias en el hígado después de choque hemorrágico ^[39]. Sin embargo, se requería una dosis muy elevada de

péptido AG (150 mg/kg), donde observamos claros efectos usando 10 mg/kg en nuestro estudio. No obstante, este y nuestro estudio indican que el uso de oligopéptidos específicos puede considerarse como agentes terapéuticos para el tratamiento de la respuesta inflamatoria después de traumatismo severo.

- 5 En resumen, una única administración de un oligopéptido sintético (LQGV, AQGV, LAGV) después de la inducción de hemorragia severa por traumatismo reduce la posterior respuesta pro-inflamatoria. Estos datos sugieren que estos oligopéptidos tienen potencial terapéutico, para minimizar el posterior daño tisular y orgánico potencialmente mortal que está asociado con hemorragia severa por traumatismo.

10 Referencias

1. Vincent JL., Carlet, J., Opal, S.M., eds., The sepsis text, 2002
2. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885-891
3. Osborn TM, Tracy JK, Dunne JR, Pasquale M, Napolitano LM. Epidemiology of sepsis in patients with traumatic injury. *Crit Care Med.* 2004; 32(11):2234-40
4. DS, Lefering R, Wade CE..Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J Trauma*, 2006, 60(6):83-11 .
5. Muylle L. The role of cytokines in blood transfusion reactions. *Blood Rev* 1995; 9:77-83.
6. Matsutani T, Kang SC, Miyashita M, Sasajima K, Choudhry MA, Bland KI, et al. Liver cytokine production and ICAM-1 expression following bone fracture, tissue trauma, and hemorrhage in middle-aged mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292:268-74
7. Rothoerl RD, Schebesch KM, Kubitz M, Woertgen C, Brawanski A, Pina AL. ICAM-1 and VCAM-1 expression following aneurysmal subarachnoid hemorrhage and their possible role in the pathophysiology of subsequent ischemic deficits. *Cerebrovasc Dis* 2006; 22:143-9
8. Sun LL, Ruff P, Austin B, Deb S, Martin B, Burris D, et al. Early up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression in rats with hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 1999; 11:416-22.
9. Ferguson KL, Taheri P, Rodriguez J, Tonapi V, Cardello A, Dechert R. Tumor necrosis factor activity increases in the early response to trauma. *Acad Emerg Med.* 1997; 4(11):1035-40.
10. Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, Deitch EA. The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 1995; 4:193-9
11. Yang R, Han X, Uchiyama T, Watkins SK, Yaguchi A, Delude RL, Fink MP, IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;285(3): G621-9
12. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzuki S, Kurokawa A, Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 22.1999; 1262-1264.
13. Snyder EL. The role of cytokines and adhesive molecules in febrile non-hemolytic transfusion reactions. *Immunol Invest* 1995; 24:333-9.
14. Winkelstein A, Kiss JE. Immunohematologic disorders. *Jama* 1997; 278:1982-92.
15. Davenport R. Cytokines and erythrocyte incompatibility. *Curr Opin Hematol* 1994; 1:452-6
16. Davenport RD. The role of cytokines in hemolytic transfusion reactions. *Immunol Invest* 1995; 24:319-31.
17. Zhu XL, Zellweger R, Zhu XH, Ayala A, Chaudry IH, Cytokine gene expression in splenic macrophages and Kupffer cells following haemorrhage, *Cytokine.* 1995; 7(1):8-14.
18. fong Y, Tracey KJ., Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS., Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, Cermani CA, Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia, *J.Exp. Med.*, 1989; 1;170(5):1627-33
19. Robinson MK, Rounds JD, Hong RW, Jacobs DO, Wilmore DW. Glutathione deficiency increases organ

dysfunction after hemorrhagic shock. *Surgery* 1992; 112:140-7; *discussion* 8-9

20. Sacks G, Sargent I, Redman C, An innate view of human pregnancy. *Immunol Today*, 1999, 20(3):114-8

21. Muyan M. and Boime I., Secretion of chorionic gonadotrophin from human trophoblast. *Placenta*, 1997; 19(4):237-41

22. Alexander H, Zimmermann G, Lehmann M, Pfeiffer R, Schone E, Leiblein S, Ziegert, M, HCG secretion by peripheral mononuclear cells during pregnancy, *Domest Anim Endocrinol.*;1998; 15(5):377-87

23. Khan NA, Khan A, Savelkoul HF, Benner R, Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor. *Hum Immunol.*, 2001, 62(12):1315-23.

24. Cole LA, The deactivation of hCG by nicking and dissociation. *J. Clin Endocrinol metab.*,1993; 76(3)704-10

25. Benner R, Khan NA. Dissection of systems, cell populations and molecules. *Scand J Immunol* 2005; 62 Suppl 1: 62-6.

26. Khan NA, Khan A, Savdldkul HF, Benner R. Inhibition of septic shock in mice by an oligopeptide from the beta-chain of human chorionic gonadotrophin hormone. *Hum Immunol* 2002; 63:1-7

27. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, Delabesse E, Macintyre E, Gottardi E, Saglio G, Watzinger F, Lion T, van Dongen JJ, Hokland P, Gabert J.Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003; 17:2474-2486.

28. Childs EW, Wood JG, Smalley DM, Hunter FA, Cheung LY. Leukocyte adherence and sequestration following hemorrhagic shock and total ischemia in rats. *Shock*. 1999;11(4):248-52

29. Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease, *Am J Gastroenterol*. 2002 ; 97(8):2000-4.

30. Olsen NJ, Stein CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004 350(21): 2167-79

31. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD, Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.*, 2000, 26 (1) 5124-8

32. Jit M, Henderson B, Stevens M, Seymour RM, TNF-alpha neutralization in cytokine-driven diseases: a mathematical model to account for therapeutic success in rheumatoid arthritis but therapeutic failure in systemic inflammatory response syndrome. *Rheumatology*, 2005 Mar;44(3):323-31.

33. Yang R, Han X, Uchiyama T, Watkins SK, Yaguchi A, Delude RL, Fink MP, IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(3): G621-9

34. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzuki S, Kurokawa A, Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 27:1999; 1262-1264

35. Stites DP, Pavia CS, Clemens LE, Kuhn RW, Siiteri PK, Immunologic regulation in pregnancy, *Arthritis Rheum*. 1979 22(11):1300-7.

36. Saito S, Cytokine network at the feto-maternal interface, *J Reprod Immunol.*, 2000, 47(2):87-103.

37. Puett D, Li Y, DeMars G, Angelova K, Fanelli F, A functional transmembrane complex: the luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein, *Mol Cell Endocrinol*. 2007 2;260-262:126-36.

38. Bai JPF, Subramanian P, Mosberg HI and Amidon GL, Structural requirements for the intestinal mucosal-cell peptide transport: the need for N-terminal a-amino group, 1991, *Pharm Res* 8: 593-599.

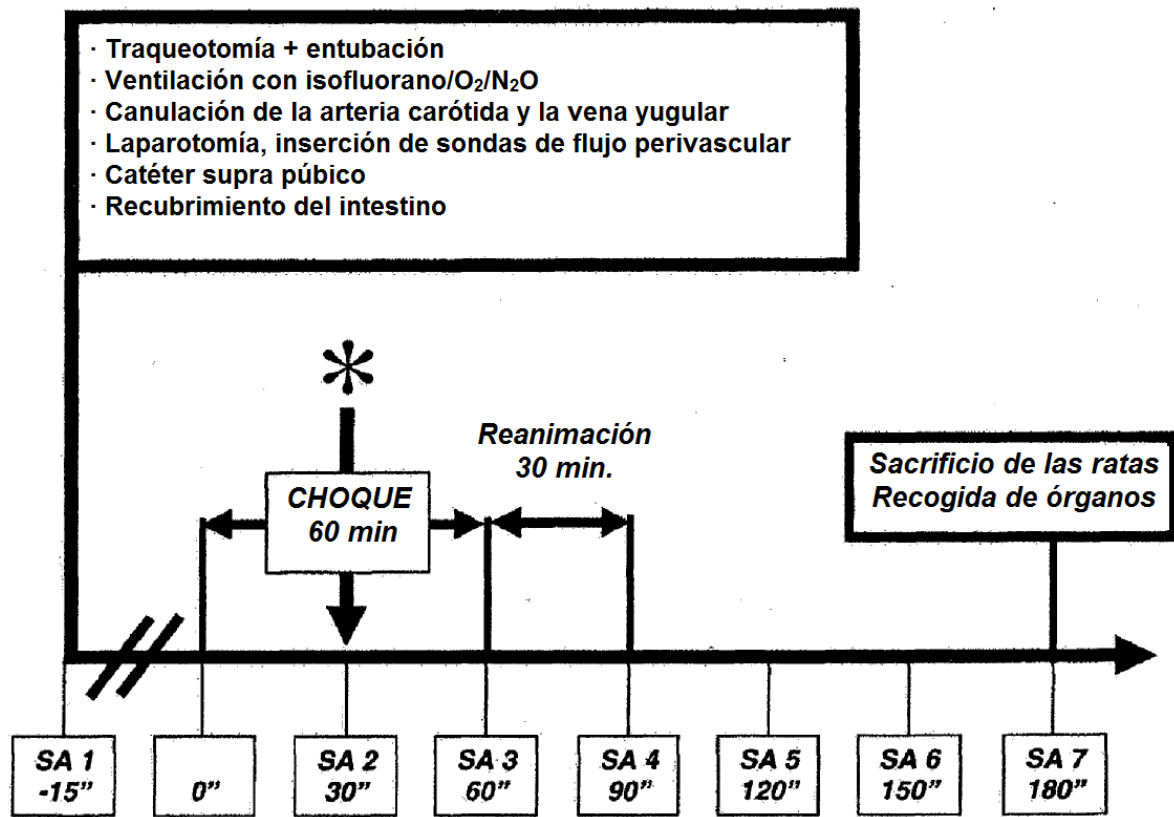
39. Yang R, Tan X, Thomas AM, Steppacher R, Qureshi N, Morrison DC, Van Way CW 3rd. Alanine-glutamine dipeptide (AGD) inhibits expression of inflammation-related genes in hemorrhagic shock. *J Parenter Enteral Nutr*. 2007;31(1):32-6.

Tabla 1. Cebadores y sondas usados para determinar los niveles de transcripción de TNF- α , IL-6, ICAM-1 y GAPDH.

Transcrito de ARNm	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda	Tamaño del producto (pb)
TNF- α	F-RAT-TNF α -EMC TGCCTCAGCCTCTTCTC ATTC	R-RAT-TNF α -EMC GGTCTGGGCCCATGGA ACTG	T-RAT-TNF α -EMC FAM- CCACCACGCTCTTCTGCTCTACTGAACTTCG- TAMRA	138
IL-6	F-RAT-IL6-EMC2 CAGAGGATACCAACCCAC AACAGA	R-RAT-IL6-EMC2 GCCATTGCACAACTC TTTTCTCA	T-RAT-IL6-EMC FAM- ACCACTTCACAAGTCGGAGGCTTAATTACAT ATGTTCT-TAMRA	106
ICAM-1	F-RAT-ICAM1-EMC TGGGGAAGACAGCAGA CCA	R-RAT-ICAM1-EMC CAGCGCAGGATGAG GTTCT	T-RAT-ICAM1-EMC FAM-CACCCACGCGAGTCCTCGGCTTCTG- TAMRA	153
GAPDH	F-RAT-GAPDH-EMC GGATACCAACCCACAACA GACCAGTA	R-RAT-GAPDH-EMC TTTGGCCCCCACCCT TCA	T-RAT-GAPDH-EMC FAM- ACTCCACGACATACTCAGCACCAGCATCA- TAMRA	131

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de al menos un tetrapéptido aislado o sintético seleccionado entre el grupo que consiste en LQGV, AQGV y LAGV y derivados funcionales de los mismos, donde un resto de L-aminoácido está sustituido con un D-aminoácido, o una sal de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptable del mismo, para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de un sujeto que padece o se cree que está padeciendo hemorragia por traumatismo.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho péptido se selecciona entre el grupo que consiste en LQGV, AQGV y LAGV.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende el uso de una mezcla de (i) un tetrapéptido seleccionado entre el grupo que consiste en LQGV, AQGV y LAGV y (ii) un péptido adicional capaz de reducir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en un modelo animal de hemorragia por traumatismo o choque hemorrágico.
4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho tetrapéptido es LQGV.
5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho tetrapéptido es AQGV.
- 20 6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho tetrapéptido es LAGV.
- 25 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho tratamiento de hemorragia por traumatismo también comprende proporcionar a dicho sujeto sangre o productos sanguíneos tales como glóbulos rojos (RBC), plaquetas, plasma, o combinaciones de los mismos.



Modelo de choque hemorrágico (HS)
 (* = tiempo de administración de péptido A, B o C en los grupos de péptido)

FIG. 1

Presión arterial media en experimentos simulados, de choque, y de péptido A, B y C

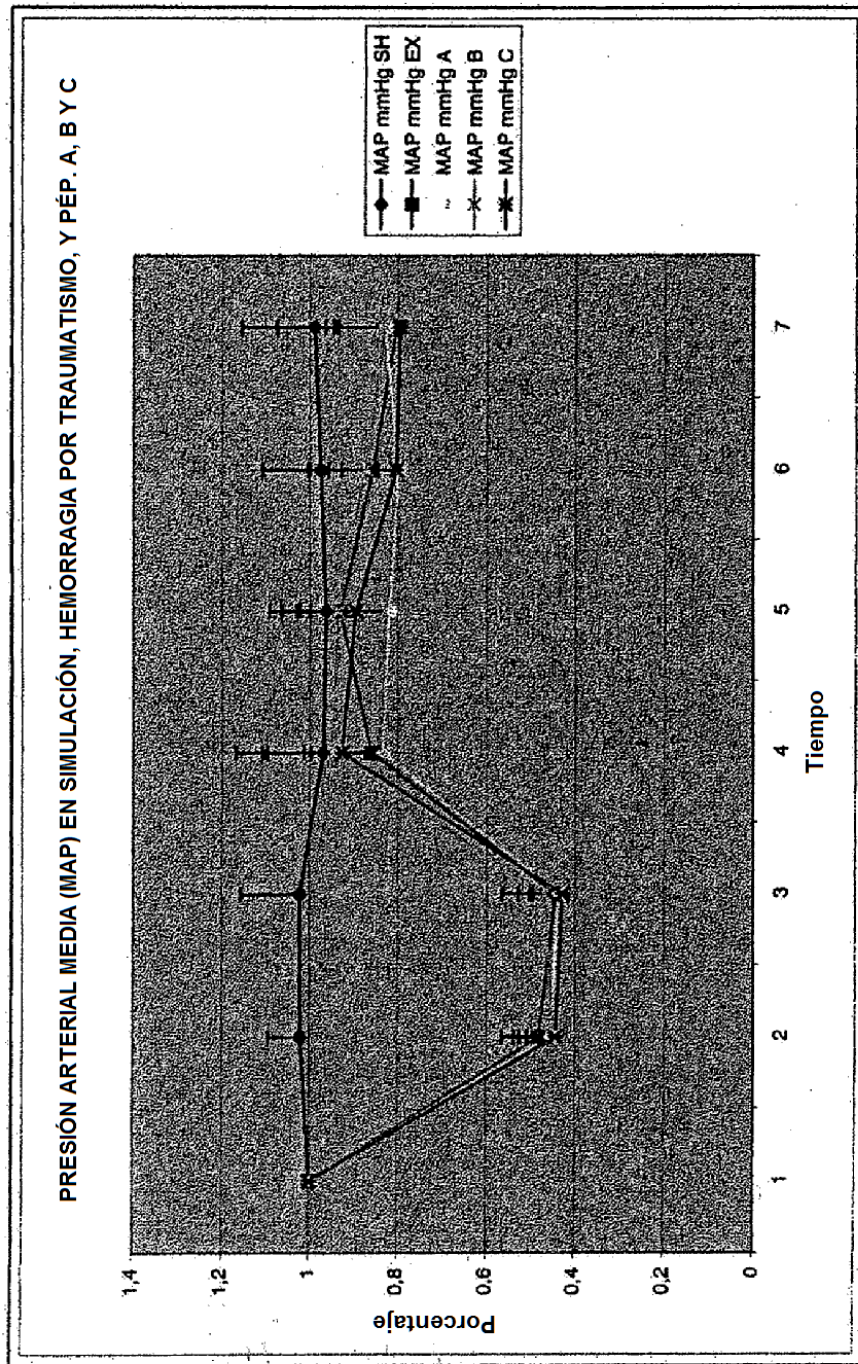


FIG. 2

Hematocrito en (de izquierda a derecha) experimentos simulado, de choque, y de péptido A, B y C

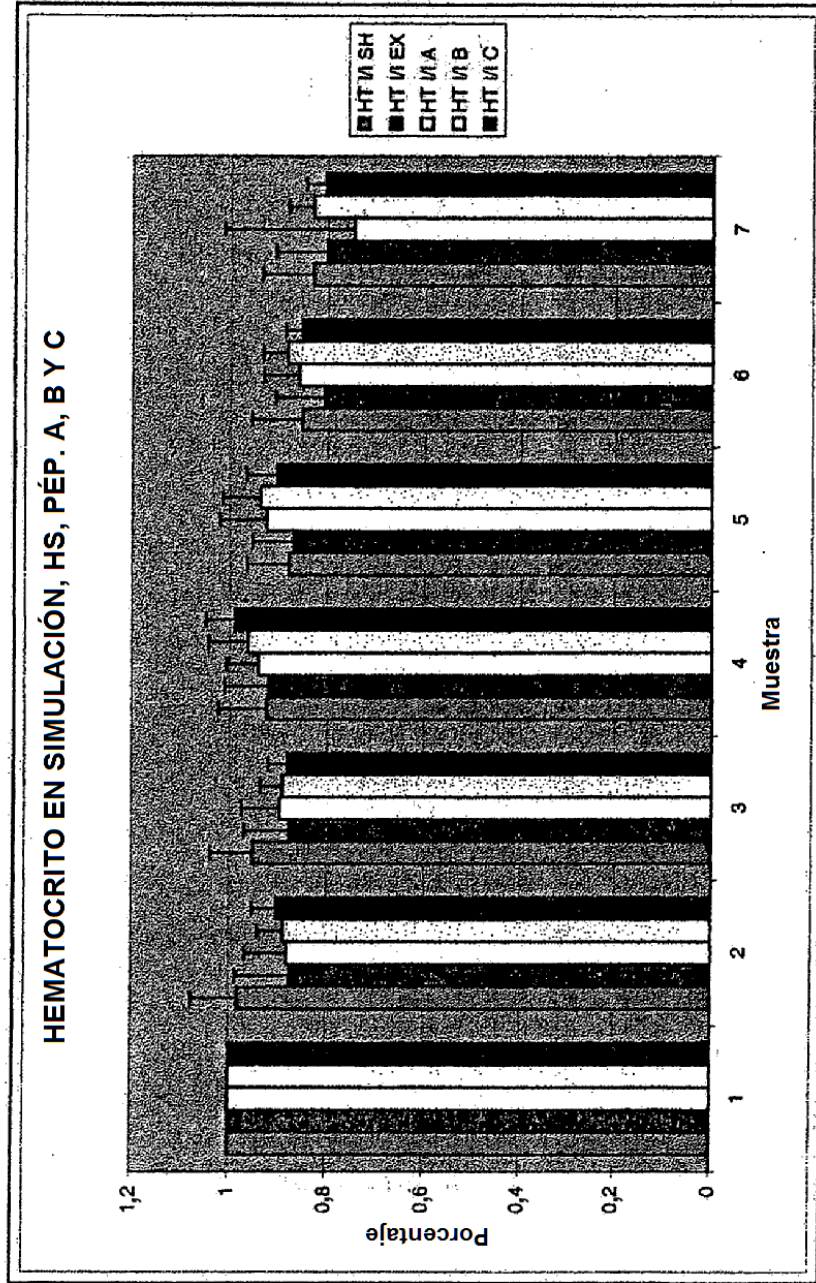


FIG. 3

Leucocitos durante experimentos simulado, de hemorragia por traumatismo, de pép. A, B y C

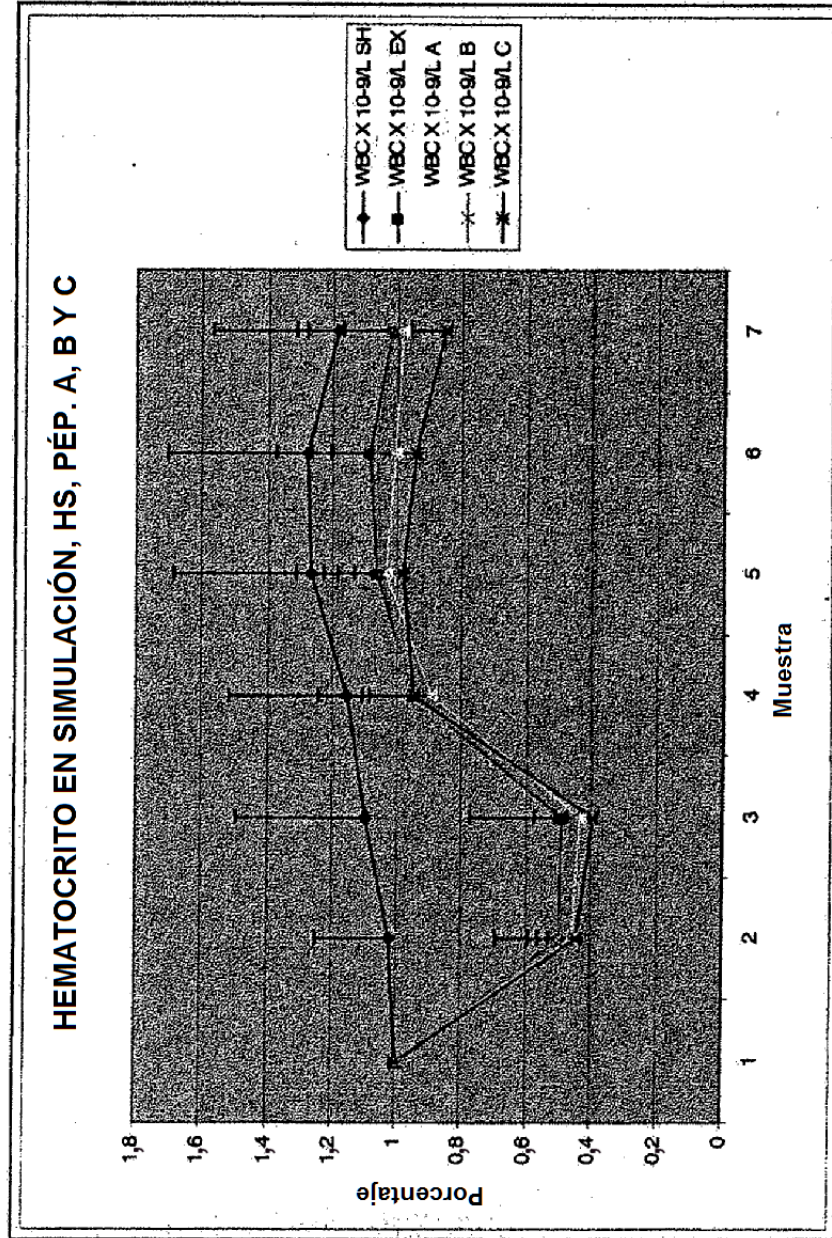


FIG. 4

Macrófagos (MO) y granulocitos (GR) en (de izquierda a derecha) experimentos simulado, choque hemorrágico por traumatismo, y Péptido A, B y C

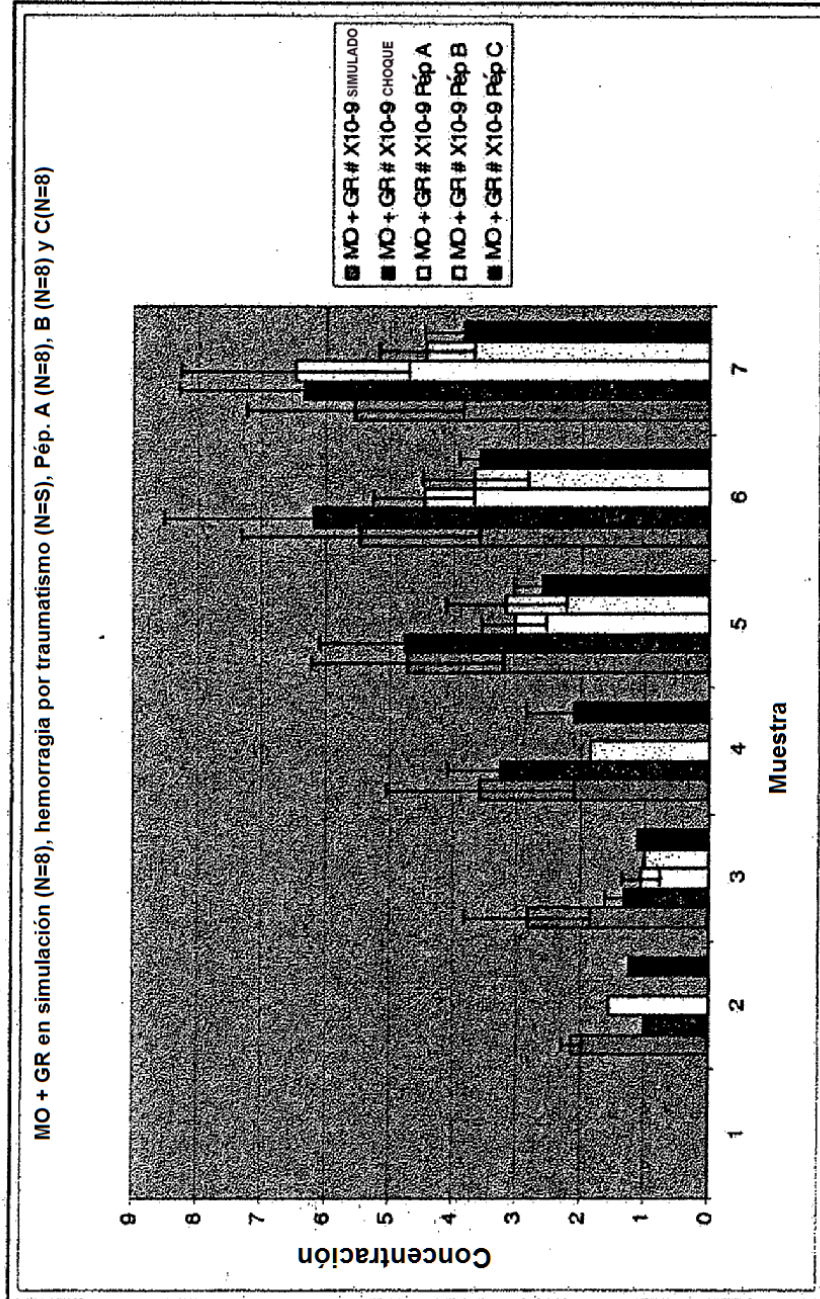


FIG. 5

Flujo de sangre arterial en (de izquierda a derecha) experimentos simulado, de choque, y de péptido A, B y C

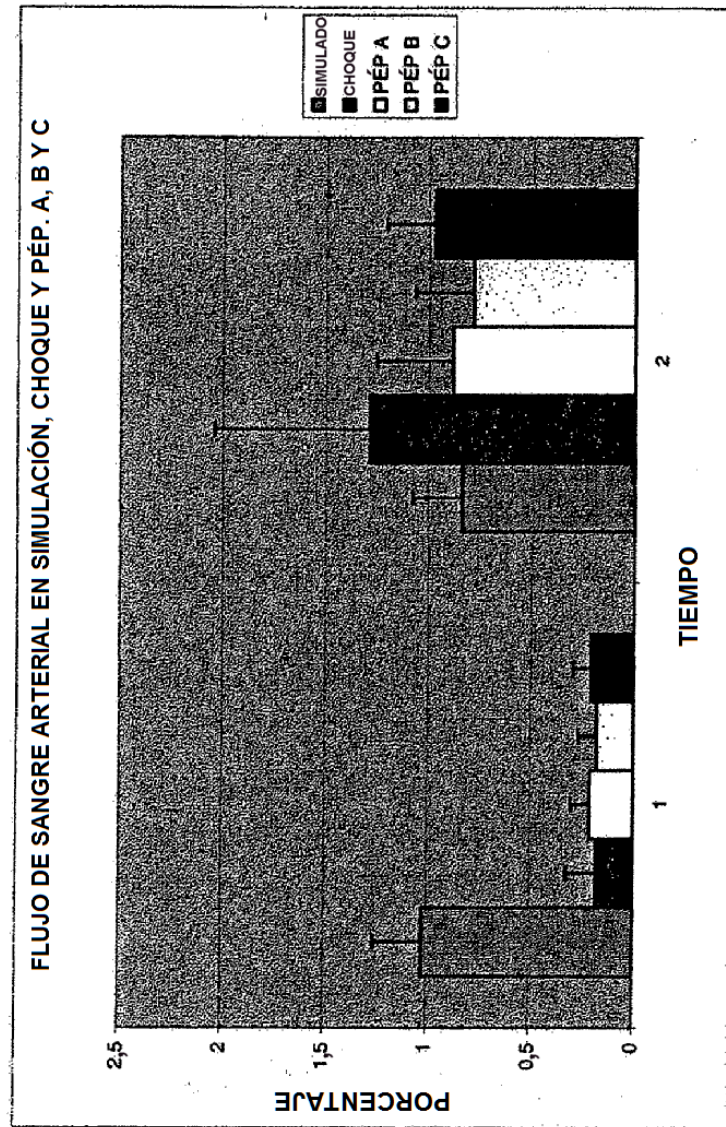


FIG. 6

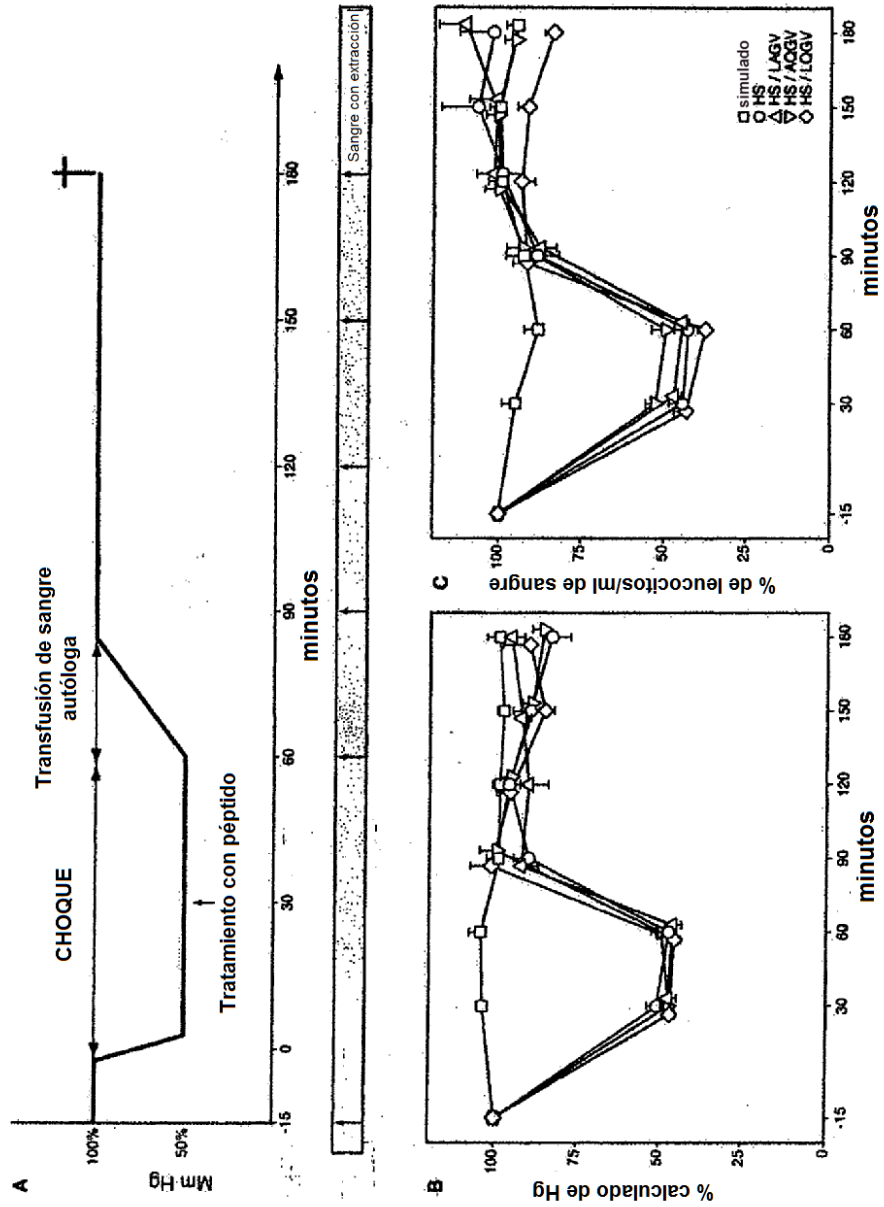




FIG. 8

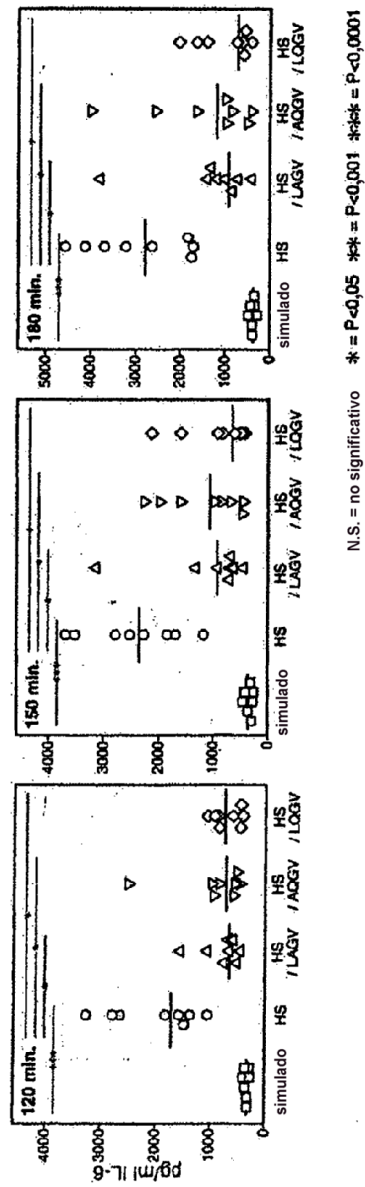


FIG. 9

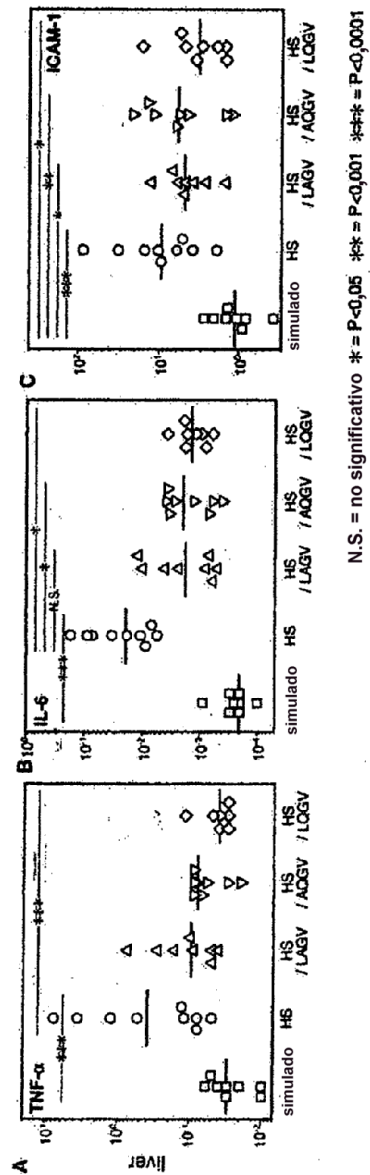


FIG. 10