(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 622 714**

(51) Int. CI.:

A61K 39/39 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2010 PCT/EP2010/070111**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011 WO11080126**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10790854 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2519259**

(54) Título: **Agonistas de los receptores TLR 4 y 9 para prevenir las complicaciones sépticas de la inmunodepresión post-traumática en los pacientes hospitalizados por traumatismos severos**

(30) Prioridad:

28.12.2009 FR 0906372

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2017

(73) Titular/es:

CHU NANTES (50.0%)
5 allée de l'Ile Gloriette
44000 Nantes, FR y
UNIVERSITÉ DE NANTES (50.0%)

(72) Inventor/es:

ASEHNOUNE, KARIM

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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

Agonistas de los receptores TLR 4 y 9 para prevenir las complicaciones sépticas de la inmunodepresión post-traumática en los pacientes hospitalizados por traumatismos severos.

La presente invención se refiere a unas composiciones y a unos procedimientos útiles para prevenir las complicaciones sépticas en los pacientes hospitalizados que presentan una inmunodepresión sistémica consecutiva a uno o varios traumatismos severos.

Más precisamente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un agonista del receptor de tipo Toll ("Toll Like receptor" o TLR) 4 (TLR4), para su utilización en el tratamiento profiláctico de las complicaciones sépticas de la inmunodepresión sistémica post-traumática en un paciente que ha sufrido uno o varios traumatismos severos, hospitalizado, en particular en un servicio hospitalario de reanimación, en la que dicho agonista del TLR 4 es el lípido A monofosforilo (MPLA) o el lípido A monofosforilo 3-O desacilado (3D-MPLA) y dicho agonista de TLR 9 es un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN).

La presente descripción describe también una composición farmacéutica que comprende por lo menos un agonista de por lo menos un receptor de tipo Toll ("Toll Like receptor" o TLR) seleccionado de entre los TLR 4 y 9, para su utilización en el tratamiento profiláctico de las complicaciones sépticas de la inmunodepresión sistémica post-traumática en un paciente que ha sufrido uno o varios traumatismos severos, hospitalizado, en particular en un servicio hospitalario de reanimación. Preferentemente, dicho agonista del TLR 4 es el lípido A monofosforilo (MPLA) o el lípido A monofosforilo 3-O desacilado (3D-MPLA) y dicho agonista del TLR 9 es un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN).

Los traumatismos severos son en Francia y en Estados Unidos, la primera causa de mortalidad de los treinta últimos años de vida y, más globalmente, la cuarta causa de fallecimiento con respectivamente más de 160000 y 10000 muertos cada año (Mathers *et al*. 2006; Patton *et al*. 2009). Si se excluye la mortalidad directamente relacionada con el traumatismo en sí, la mortalidad secundaria post-traumática se debe esencialmente a una inmunodepresión sistémica (IS) específica, severa y prolongada (Keel *et al*. 1996). La respuesta fisiológica a un traumatismo se basa en una activación neuro-humoral compleja. La desregulación de la inmunidad por mediación celular es responsable de una desregulación inmunitaria (Keel *et al*. 1996; Ditschkowski *et al*. 1999). El choque hemorrágico es una causa principal de este desorden inmunitario debido a la importancia de las lesiones de isquemia (deprivación tisular en oxígeno durante la fase de isquemia (sangrado)) y reperfusión (liberación masiva de compuestos tóxicos y de mediadores de la inflamación durante la reanimación del herido) (Stephan *et al*. 1989). Además, las lesiones tisulares actúan de manera sinérgica con la hemorragia para modular de manera muy específica la respuesta inmunitaria de los pacientes traumatizados (Wichmann *et al*. 1998). En el caso bien particular de los pacientes hospitalizados por traumatismo o politraumatismo severo, la IS post-traumática que las caracteriza es directamente responsable de complicaciones sépticas, generalmente de infecciones secundarias adquiridas en medio hospitalario (o infecciones nosocomiales).

La IS post-traumática y las complicaciones sépticas asociadas son por lo tanto dos objetivos prioritarios si se desea mejorar en el futuro el pronóstico de los traumatismos severos, ya que el coste humano y económico de las complicaciones infecciosas post-traumáticas sigue siendo considerable. En efecto, las infecciones son las primeras causas de mortalidad secundaria en traumatología pesada. La aparición de una infección en un paciente traumatizado grave eleva la mortalidad antes citada del 7 al 21%, aumenta la duración de hospitalización en reanimación de 5 a 21 días de promedio y prolonga la duración de hospitalización de 7 a 34 días (Rincon-Ferrari *et al*. 2004; Papia *et al*. 1999). Como ejemplo, el sobrecoste global relacionado con las neumopatías adquiridas bajo ventilación mecánica (PAVM) se evalúa, en Francia, en 800 millones de euros por año. Finalmente, según un informe de la OMS publicado en 2005, el coste del tratamiento de 5 infecciones nosocomiales de gravedad media equivale al conjunto del presupuesto anual previsto para la compra de productos de higiene de las manos de un servicio de hospitalización.

Esto refleja, por un lado, la ineficacia de los medios actuales de prevención de las infecciones nosocomiales para esta población particular de pacientes y, por otro lado, la importancia medico-económica de este problema de salud pública (SFAR 2005).

Las alteraciones de presentación del antígeno son una causa principal de la sepsis que sigue a un traumatismo o un politraumatismo severo. Las capacidades de presentación del antígeno se han estudiado en el marco del estrés agudo, en particular séptico o traumático. Estos estudios se refieren esencialmente a la expresión de HLA-DR sobre unos monocitos sanguíneos. En los pacientes que sufren de un traumatismo grave, se ha demostrado que la expresión membranaria monocitaria de HLA-DR era significativamente inferior a la observada en voluntarios sanos (Venet *et al*. 2007). Ditschkowski *et al*. (1999) han estudiado la expresión membranaria monocitaria de HLA-DR en 66 politraumatizados severos durante los 14 primeros días de hospitalización. Los veinte pacientes que han presentado una sepsis durante su evolución presentaban a partir del D0 y hasta el D14 una disminución importante de la expresión de HLA-DR monocitaria con respecto a los 46 politraumatizados que no han presentado infecciones durante su estancia. Una disminución de la expresión de HLA-DR también se ha observado en pacientes quirúrgicos

y, de nuevo, esta constatación se acompañaba de un aumento de las complicaciones sépticas y de una sobremortalidad en estos pacientes (Ditschkowski *et al*. 1999). Se muestra, a la vista de estos datos que, tras aparecer el traumatismo, se instaura muy rápidamente una fase de desactivación del sistema inmunitario marcada por una disminución de la capacidad para presentar el antígeno por los monocitos (disminución de expresión de HLA-DR). Es precisamente este padecimiento bien específico del sistema inmunitario de los pacientes, consecutivamente a un traumatismo o politraumatismo severo, el que favorece la aparición de infecciones nosocomiales y está correlacionada con un exceso de mortalidad preocupante.

En la actualidad, la fisiopatología del traumatismo severo y de sus complicaciones secundarias sigue estando basada en consideraciones clínicas exclusivas. Ahora bien, los inventores son los primeros en proponer un enfoque original que tiene en cuenta el estado fisiológico y patológico, en particular inmunológico, de los pacientes que padecen traumatismos severos. Como se describe en detalle a continuación, los inventores han desarrollado el primer modelo animal que reproduce la IS post-traumática observada en el ser humano y combinada con una neumopatía, con el fin de imitar la patología humana de la manera más realista posible. Gracias a sus trabajos, realizados en particular con la ayuda de este modelo animal, los inventores han conseguido explicar la incidencia de las complicaciones sépticas de IS post-traumática en los pacientes hospitalizados por traumatismos severos, y proponen por primera vez unos medios adecuados y eficaces para prevenir estas complicaciones.

Desde hace una decena de años, y posteriormente al descubrimiento de los TLR, la inmunidad innata se ha vuelto un tema de estudio particularmente extendido. La inmunidad innata permite una defensa anti-infecciosa específica muy eficaz, lo más frecuentemente suficiente para erradicar un foco infeccioso. El estudio de la inmunidad innata ha permitido descubrir que reconocía muy específicamente unas unidades moleculares, conservadas en numerosos patógenos, los PAMP (por "pathogen-associated molecular patterns"), esencialmente a través de unos TLR que pertenecen a la familia de los "Pattern Recognition Receptors" (PRR). Los PAMP son de origen muy diverso (bacteria, virus, parásito, etc.) y de naturaleza variada (proteína, azúcar, ácido nucleico, etc.). En términos de estructura, los TLR son unas proteínas transmembranarias de tipo I que comprenden un dominio extracelular receptor de la señal de peligro y compuesto por numerosas unidades de tipo "repeticiones ricas en leucina" o LRR (por "leucin-rich repeats"), un dominio transmembranario y un dominio intracelular que contiene un dominio que permite la transducción de la señal de activación (denominado "death domain"). Los TLR son ampliamente expresados por numerosos tipos de células, por ejemplo células de la sangre, del bazo, de los pulmones, de los músculos, de los intestinos, etc. Los TLR representan, en los mamíferos en particular, unas proteínas clave que permiten detectar una infección e iniciar una respuesta inmunitaria apropiada. La mayoría de las especies de mamíferos cuenta con entre 10 y 15 tipos de TLR. En particular, 13 TLR (TLR 1 a TLR 13) han sido identificados en el ratón, y 10 en el ser humano. Cada TLR es capaz de reconocer específicamente algunos PAMP. Por ejemplo, el receptor TLR 4 tiene como ligandos naturales el LPS de la pared bacteriana y unas glicoproteínas de origen viral. El receptor TLR 9, por su parte, reconoce los islotes CpG no metilados del ADN bacteriano y viral.

Así, los TLR y sus agonistas aparecen como unos objetivos principales de búsqueda para el desarrollo de terapias eficaces en el campo de la lucha contra las infecciones.

Entre los agonistas conocidos de TLR, se pueden citar en particular el MPLA y los CgP. El MPLA o lípido A monofosforilo es un derivado no tóxico del lipolisacárido (LPS) procedente de una cepa de *Salmonella Minnesota*. Actúa esencialmente a través de TLR 4. En términos de estructura, el MPLA y el MPLA 3-O desacilado (o 3D-MPLA) poseen un esqueleto glucídico en el que se fijan unos ácidos grasos de cadena larga. Son unas moléculas muy hidrófobas. El MPLA y el 3D-MPLA se utilizan habitualmente como adyuvantes de inmunidad asociados a preparaciones antigénicas en vacunas de prevención contra las infecciones (por ejemplo contra el virus de la gripe, influenza) o en las vacunas terapéuticas para el tratamiento de cánceres y de infecciones crónicas (véase, por ejemplo, la patente europea EP 0 971 739).

Las unidades CpG son unas moléculas cortas de ADN monocaternario que contiene una citosina "C" seguida de una guanina "G". La letra "p" en el acrónimo "CpG" designa el esqueleto fosfodiéster del ADN. Los oligodesoxinucleótiods CpG (o CpG ODN) sintéticos se distinguen de los CpG ODN microbianos por su esqueleto parcial o completamente modificado en fosforotioato "PS" (en lugar de fosfodiéster) y por una cola poliG en su(s) extremo(s) 5’ y/o 3’. La modificación PS impide la degradación de los CpG ODN por las nucleasas y la cola poliG mejora la administración por las células. Los CpG naturales son particularmente abundantes en los genomas microbianos y mucho más raros en los vertebrados. Son exclusivamente reconocidos por el TLR 9. Los CpG no metilados son utilizados en composiciones vaccíneas como adyuvantes (véase, por ejemplo, la patente europea EP 0 772 619).

Unas composiciones inmunoestimulantes que comprenden uno o varios ligandos de los TLR ya han sido propuestas con fines terapéuticos y/o profilácticos. Así, la solicitud internacional WO 2009/088401 propone mejorar la respuesta inmunitaria de un sujeto con la ayuda de tales composiciones. Unas composiciones que incluyen unos CpG y/o MPLA son así descritas para una administración a un sujeto que presenta un riesgo superior al normal de desarrollar, en un futuro indefinido, una infección, un cáncer o una alergia. Las aplicaciones anti-infecciosas consideradas en esta solicitud son puramente vaccíneas: en efecto, se trata de inmunizar un sujeto con el fin de protegerlo contra un agente infeccioso al que podría ser expuesto a lo largo de su vida. Ahora bien, típicamente, en

el campo de la vacunoterapia, nadie sabe: (i) si el sujeto vacunado estará efectivamente expuesto a lo largo de su vida al agente infeccioso contra el cual se supone que está protegido; (ii) admitiendo que el sujeto esté expuesto al agente infeccioso, cuando tendrá lugar esta exposición; (iii) si el sujeto vacunado está eficazmente protegido para no manifestar una infección en caso de exposición al agente infeccioso; y (iv) suponiendo que haya protección asociada a la vacuna, cuál es la duración real de esta protección frente a una exposición al agente infeccioso. Además, la enseñanza contenida en la solicitud WO 2009/088401 es insuficiente para demostrar la eficacia de las composiciones vaccíneas descritas.

Por el contrario, en el marco de la presente invención, por un lado, las composiciones propuestas no son vaccíneas en el sentido clásico del término y, por otro lado, la población a tratar es muy específica. Las infecciones a prevenir en el marco de la presente invención son las complicaciones sépticas posteriores a la inmunodepresión sistémica post-traumática en los pacientes hospitalizados por traumatismos severos. Estas complicaciones son susceptibles de aparecer sólo en un plazo de tiempo bien preciso a partir del día del o de los traumatismos. Además, la presente invención tiene como objetivo una categoría bien particular de pacientes, cuyo estado fisiológico y patológico, en particular inmunológico, difiere de aquel de la población objetivo de una vacunación estándar. Como se ha indicado anteriormente, los pacientes diana de la presente memoria son enfermos: padecen uno o varios traumatismos severos, mientras que la población objetivo de una campaña de vacunación clásica está generalmente sana. El estado patológico de los pacientes diana de la presente memoria no es benigno hasta el punto que justifique una administración y una vigilancia por unos equipos médicos competentes, y que necesita una hospitalización de urgencia, relativamente duradera, típicamente en uno o varios servicios hospitalarios especializados (reanimación, traumatología pesada, etc.). Como se ha indicado anteriormente, estos pacientes presentan una IS post-traumática específica, severa y prolongada que es una consecuencia directa del o de los traumatismos severos que han sufrido. Las características propias de la IS post-traumática y de las complicaciones sépticas asociadas se detallan en la descripción siguiente.

Así, la presente invención tiene por objeto una composición farmacéutica que comprende por lo menos un agonista del receptor TLR 4, para su utilización en el tratamiento profiláctico (o la prevención) de las complicaciones sépticas de la inmunodepresión sistémica post-traumática en un paciente hospitalizado que padece uno o varios traumatismos severos, siendo dicho agonista seleccionado de entre el lípido A monfosforilo (MPLA) y el lípido A monofosforilo 3-O desacilado (3D-MPLA).

Más generalmente, la presente descripción describe una composición farmacéutica que comprende por lo menos un agonista de por lo menos un TLR seleccionado de entre los TLR 4 y 9, para su utilización en el tratamiento profiláctico (o la prevención) de las complicaciones sépticas de la inmunodepresión sistémica post-traumática en un paciente hospitalizado que padece uno o varios traumatismos severos.

La invención tiene como diana una población muy particular de pacientes. Los pacientes considerados padecen uno o varios traumatismos severos. Para simplificar, se podrá hablar de "pacientes traumatizados graves" o "pacientes traumatizados severos". Preferentemente, los pacientes en cuestión presentan por lo menos dos lesiones traumáticas entre las cuales por lo menos una lesión compromete el pronóstico vital (es decir que puede matar a corto plazo). De manera más preferida, los pacientes traumatizados severos presentan un resultado de gravedad de las lesiones ("Injury Severity Score" o ISS) de por lo menos 16. Para los traumatismos muy severos, el ISS es de por lo menos 25. El cálculo del resultado ISS toma en cuenta el alcance de varias regiones del organismo del paciente (cabeza y cuello; cara; tórax; abdomen y pelvis; pelvis y miembros; piel y tejidos subcutáneos). El alcance de cada región se califica del 1 al 6 en función de su gravedad (1: lesión menor, 6: lesión crítica). El ISS se calcula después poniendo al cuadrado del resultado de las tres regiones más afectadas (por ejemplo, si las calificaciones de cada región son los siguientes: cabeza 4, abdomen 3, tórax 2, otras regiones 1, entonces el ISS valdrá $4^2+3^2+2^2$ = 16+9+4 = 29 (Backer *et al.*, 1974). Alternativa o adicionalmente, los pacientes traumatizados considerados en el marco de la invención presentan un traumatismo craneal severo definido por el resultado de Glasgow (CGS) inferior a 8. La determinación del CGS es un procedimiento que permite apreciar la profundidad de un coma mediante el estudio de la variabilidad de 3 criterios clínicos muy precisos que son: 1) la apertura de los ojos (calificado de 1: ausente a 4: apertura espontánea de los ojos), 2) las capacidades de movilidad (facultad para moverse), o si se prefiere la mejor respuesta motriz (calificada de 1: ausente a 6: movimientos adaptados), y 3) la respuesta a las preguntas (respuestas verbales, calificada de 1: ausente a 5: respuesta orientada). El CGS es la suma de los resultados obtenidos en los tres criterios clínicos citados anteriormente. Por lo tanto, es de mínimo 3 y máximo 15 (Teasdale *et al.*, 1974).

Como se ha explicado anteriormente, la población particular de pacientes considerada en la invención se distingue por una IS post-traumática muy específica.

Esta IS post-traumática se caracteriza preferentemente por:

a) una bajada del nivel de producción *ex vivo* de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por unos leucocitos sanguíneos después de la estimulación por LPS de bacilos gram negativo, por ejemplo *Escherichia coli*, con respecto al nivel de producción observado para un individuo sano; y/o

b) una disminución del nivel de expresión de HLA-DR sobre las células presentadoras de los antígenos de los pacientes, con respecto al nivel de expresión observado para un individuo sano.

Estas características del IS post-traumático se han confirmado por la bibliografía (Keel *et al*. 1996; Spolarics *et al*. 2003; Cheadle *et al*. 1991). La disminución observada del nivel de producción de citoquinas (expresado por ejemplo en picogramos/ml) se entiende frente a voluntarios sanos cuyo nivel de producción de citoquinas representa el valor del 100%. Las citoquinas se miden típicamente en unos cultivos de sangre entera estimulada por LPS (de *Escherichia coli* en general). La expresión de HLA-DR se expresa frente a voluntarios sanos, o bien en número de moléculas de HLA-DR expresadas en la superficie de las células (MFI por "mean fluorescence intensity") o bien en porcentaje, representando el valor del 100% el nivel de expresión de HLA-DR en voluntarios sanos. De manera particular, si se razona en porcentaje, la disminución en a) y/o b) anterior es de por lo menos un 20% aproximadamente. Es preferentemente de por lo menos un 25% aproximadamente, más preferentemente de por lo menos un 30, un 35, un 40, o un 45% aproximadamente, y de manera más preferida de por lo menos un 50, un 55, o un 60% aproximadamente, incluso más.

Más preferentemente, la IS post-traumática observada en los pacientes traumatizados severos es tal que el nivel de expresión de HLA-DR sobre los monocitos de dichos pacientes en las 24 horas tras el o los traumatismos del D0 al D1) disminuye con respecto al nivel de expresión observado para un individuo sano. Esta disminución inicial puede por otro lado permitir, en la práctica, predecir el riesgo de complicaciones sépticas (o infecciones secundarias). Así, un bajo nivel de expresión de HLA-DR sobre los monocitos el primer día después del o de los traumatismos severos (D1), por ejemplo una disminución del 50%, es predictivo de un riesgo elevado para el paciente de contraer una infección secundaria. La expresión de HLA-DR se expresa frente a voluntarios sanos, o bien en número de moléculas de HLA-DR expresadas en la superficie de las células (MFI por "mean fluorescence intensity"), o bien en porcentaje, representando el valor del 100% el nivel de expresión de HLA-DR en voluntarios sanos. En particular, si se razona en porcentaje, la disminución del nivel de expresión de HLA-DR es de por lo menos un 20% aproximadamente, preferentemente de por lo menos un 25% aproximadamente, más preferentemente de por lo menos un 30, un 35, un 40, o un 45% aproximadamente, y de manera más preferida de por lo menos un 50, un 55, o un 60% aproximadamente, incluso más.

A la luz de los párrafos anteriores, un experto en la materia comprenderá fácilmente que el estado patológico de la población particular de pacientes considerada por la presente invención se puede definir de manera necesaria y suficiente por las características antes mencionadas. Este estado patológico y los riesgos de complicaciones sépticas que le están asociadas intervienen en una escala de tiempo limitada y muy específica, tras el o los traumatismos que han llevado a dichos pacientes a un servicio hospitalario de reanimación. En particular, la inmunodepresión sistémica post-traumática en cuestión en el marco de la presente invención implica unos mecanismos anti-inflamatorios y se distingue por lo tanto de los estados patológicos que implican unas reacciones pro-inflamatorias de tipo SIRS, en particular en el marco de la sepsis.

Las complicaciones sépticas (o infecciones secundarias) que la composición farmacéutica objeto de la presente invención permite prevenir son más particularmente unas infecciones nosocomiales, en particular bacterianas. En particular, las infecciones bacterianas involucradas se seleccionan de entre las neumopatías, tales como PAVM, las infecciones urinarias, las infecciones sobre catéteres venosos centrales, las infecciones bacterianas cerebromeníngeas tales como las meningitis, empiemas y abscesos cerebrales. Más particularmente aún, la neumopatías se deben a bacterias patógenas seleccionadas de entre los estafilococos, preferentemente *Staphylococcus aureus*, más preferentemente *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, *Heamophilus sp.*, preferentemente *H. influenzae*, los neumococos, las enterobacterias, *Pseudomonas sp*., en particular *P. aeruginosa*. Las bacterias origen de las neumopatías pueden también pertenecer a otros géneros o especies bacterianas (por ejemplo, unos bacilos gram negativos y unos cocos gram positivos). Además, pueden ser resistentes a los antibióticos. Tratándose de las infecciones diferentes de las neumopatías, las bacterias responsables pueden ser, por ejemplo unos bacilos gram negativos (por ejemplo, *E. coli, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa*) y unos cocos gram positivos (por ejemplo, *S. aureus*) para las infecciones urinarias; unos bacilos gram negativos (por ejemplo, *E. coli, P. mirabilis, P. aeruginosa*), unos cocos gram positivos (por ejemplo, *S. aureus,* unos estafilococos coagulasa negativos) y unas levaduras tales como *Candida* sp. Para las infecciones sobre catéteres centrales; unos bacilos gram negativos (por ejemplo, *E. coli, P. mirabilis, P. aeruginosa*) y unos cocos gram positivos (por ejemplo, *S. aureus,* unos estafilococos coagulasa negativa, *Streptococcus pneumoniae*) para las infecciones bacterianas cerebromeníngeas.

Se comprenderá que, en la composición farmacéutica según la presente invención, el o los agonistas de TLR está(n) presente(s) en una cantidad eficaz (o cantidad farmacéuticamente eficaz). Esto significa que la cantidad de agonistas en la composición es tal que una vez administrada, ésta es capaz de prevenir las complicaciones sépticas de la inmunodepresión sistémica post-traumática en un paciente hospitalizado que padece uno o varios traumatismos severos.

La composición farmacéutica descrita en la presente descripción puede comprender por lo menos un agonista de LTR 4 y por lo menos un agonista de TLR 9.

El término "agonista" designa en la presente memoria cualquier molécula o combinación de moléculas que estimula un receptor. Por ejemplo, un agonista de TLR puede ser un ligando de un TLR, un análogo o un derivado de tal ligando.

Por "molécula o combinación de moléculas que estimula un receptor TLR", se designan en la presente memoria unas moléculas que originan, a través de dicho TLR (directa o indirectamente), una cascada de señalización intracelular específica. Esta cascada de señalización hace intervenir numerosas proteínas adaptadoras tales como MyD88, MAL, TRIF y TRAM. Los agonistas de TLR4 y TLR9 activan ambos la vía de señalización MyD88. Sin embargo, los agonistas de TLR4 hacen también intervenir las proteínas MAL, TRIF y TRAM, lo que no es el caso de los agonistas de TLR9.

El reclutamiento de estas proteínas adaptadoras conduce, entre otros, a la activación de macrófagos y de células dendríticas (DC), así como a la producción de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, e inmunoglobulinas. Los agonistas de TLR activan más particularmente los macrófagos y las células dendríticas mieloides mientras que los agonistas de TLR9 activan los macrófagos, las células dendrítricas plasmacitoides (pDC) así como los linfocitos B.

Un ligando de un TLR puede ser de naturaleza química (por ejemplo, el MPLA) o biológica (por ejemplo un compuesto extraño reconocido por el sistema inmunitario como no suyo, tal como los ácidos nucleicos de bacterias, hongos o virus, y más particularmente el ácido desoxirribonucleico de *Candida albicans* o los CpG). Unos análogos o derivados de ligandos de TLR son en particular unos ligandos estructuralmente modificados (es decir, mutados si son unas moléculas biológicas o modificados en su estructura si son unas moléculas químicas), unos péptidos miméticos, y más generalmente cualquier molécula o combinación de moléculas capaz de completar la función biológica del ligando, que es de estimular el receptor.

El agonista de TLR 4 contenido en la composición según la invención es el lípido A monofosforilo (MPLA) o el lípido A monofosforilo 3-O desacilado (3D-MPLA). Se utilizará más particularmente el MPLA.

Preferentemente, el agonista de TLR9 contenido en una composición descrita en la presente descripción es un oligodesoxinucleótido CpG (CpG ODN). Se preferirá utilizar un CpG ODN sintético de por lo menos 8 nucleótidos que contienen por lo menos un dinucleótido CpG no metilado. Preferentemente, se utilizará un CpG ODN que contiene como máximo 100 nucleótidos. Más preferentemente, el CpG ODN utilizado en la composición descrita en la presente descripción contendrá de 8 a 40 nuceótidos. El experto en la materia elegirá el o los CpG ODN apropiados entre los fosfodiésteres o los fosfodiésteres que comprenden una o varias modificaciones en fosforotioato (fosfodiéster / fosforotioato), o también los fosforotioatos. Se preferirá utilizar unos CpG ODN fosfodiésteres / fosforotioatos, o fosforotioatos. Ventajosamente, se utilizarán unos CpG ODN desprovistos de secuencias palindrómicas de 4 a 8 nucleótidos aproximadamente. Se podrá elegir utilizar un CpG ODN diferente del CpG 7909 (o PF-3512676) descrito en Leonard *et al.*, (2007).

Preferentemente, la composición farmacéutica según la invención o una composición descrita en la presente descripción comprende además uno o varios excipientes o aditivos o soportes farmacéuticos aceptables. Por ejemplo, la composición según la presente invención o una composición descrita en la presente descripción puede comprender uno o varios agentes seleccionados de entre los diluyentes, los agentes anti-espuma, los estabilizantes, los colorantes, los estabilizantes, los conservantes, etc. Se preferirán utilizar unos agentes inertes, lo que significa que, en las composiciones objeto de la invención y las descritas en la presente descripción, los únicos agentes activos desde el punto de vista del tratamiento profiláctico buscado en la presente memoria, serán el o los agonistas de TLR. Sin embargo, la composición farmacéutica objeto de la presente invención, o una composición descrita en la presente descripción podrá comprender uno o varios antígenos, además de dichos agonistas de TLR. El o los antígenos, así asociados al o a los agonistas de TLR, podrán permitir la obtención de una inmunoestimulación potente y específica del o de los antígenos añadidos en la composición farmacéutica según la invención o en una composición descrita en la presente descripción. Los antígenos eventualmente utilizados son principalmente unos antígenos bacterianos, en particular unos antígenos de bacterias patógenas tales como los estafilococos, preferentemente *Staphylococcu aureus*, más preferentemente *S. aureus* sensible a la meticilina, *Haemophilus* sp., preferentemente *H. influenzae*, los neumococos, las enterobacterias, *Pseudomonas* sp., en particular *P. aeruginosa.* Los antígenos podrán proceder de otros géneros o especies bacterianos en función de las infecciones que se desea prevenir (por ejemplo, unos bacilos gram negativos tales como *E. coli*, *Proteus mirabilis*, etc., unos cocos gram positivos tales como *Streptococcus pneumoniae*, y unas levaduras tales como *Candida* sp.).

Ventajosamente, la composición según la presente invención o una composición descrita en la presente descripción se administra a los pacientes, por ejemplo por inyección, a partir de 12h aproximadamente, preferentemente a partir de 24h aproximadamente, desde de su admisión en el hospital, en particular en un servicio hospitalario de reanimación. En particular, la composición se administra después de la estabilización del estado clínico de los pacientes. Generalmente, un paciente está estabilizado cuando, según el o los tipos de lesiones que presenta, los sangrados están controlados y/o las lesiones que amenazan el pronóstico vital a corto plazo son tratados quirúrgicamente en urgencia. En la práctica, un paciente se denomina "estabilizado" si sus funciones vitales (circulatoria y respiratoria esencialmente) son estables.

La composición según la presente invención o una composición descrita en la presente descripción se administra preferentemente, una o varias veces si es necesario, en un periodo de cómo máximo 1 mes aproximadamente, preferentemente de como máximo 28 días, desde la admisión de los pacientes en el hospital, en particular en un servicio hospitalario de reanimación. En otras palabras, las complicaciones sépticas que se desea prevenir son susceptibles de aparecer (o de ser contraídas) durante como máximo 1 mes aproximadamente, preferentemente como máximo 28 días, desde la admisión de los pacientes en el hospital. Por ejemplo, se ha podido constatar que aparecían unas complicaciones sépticas en el 40 al 50% de los pacientes traumatizados severos entre el D0 y el D10, y en el 10 al 20% de los pacientes además entre el D10 y el D28, es decir el 50 al 70% de los pacientes en total habían contraído una infección secundaria (Osborn *et al.*, 2004).

En particular, la composición farmacéutica objeto de la presente invención o una composición descrita en la presente descripción podrá ser administrada una o varias veces durante el periodo de intubación de los pacientes.

Así, la presente descripción se refiere asimismo a un procedimiento de tratamiento profiláctico de las complicaciones sépticas de la inmunodepresión post-traumática en un paciente hospitalizado que padece uno o varios traumatismos severos, en la que se administra a dicho paciente una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente.

La presente descripción tiene también por objeto la utilización de por lo menos un agonista de por lo menos un TLR seleccionado de entre los TLR 4 y 9, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento profiláctico de las complicaciones sépticas de la inmunodepresión sistémica post-traumática en un paciente hospitalizado que padece uno o varios traumatismos severos.

Preferentemente, dicho medicamento es una composición farmacéutica de acuerdo con la descripción anterior.

La presente invención se ilustra mediante las figuras siguientes:

- Figura 1: Estudio piloto de los efectos del inóculo y del tiempo entre choque hemorrágico y neumopatía por *Staphyloccocus aureus* sensible a la meticilina (o "SASM") sobre la mortalidad de los ratones.

  Se han estudiado dos grupos de ratones: grupo HP (choque hemorrágico seguido de una neumopatía por SASM) y grupo P (neumopatía por SASM sola). Los datos se expresan en porcentaje y son representativos de tres experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. **A.B.C**. Efecto del inóculo sobre la mortalidad. Veinticuatro horas después de la hemorragia, se ha realizado una neumopatía por 7×10^5 UFC ***(A.)*** o 7×10^6 UFC ***(B.)*** o 7×10^7 UFC ***(C.)*** de SASM (grupo HP) y comparada a un grupo de ratones con una neumopatía sola (grupo P). La tasa de supervivencia de cada grupo se ha controlado dos veces por día durante 7 días (168 horas). Cada grupo comprendía 15 ratones. (*p ≤ 0,05 frente al grupo P). ***D.*** Efecto del tiempo sobre la mortalidad. Se ha evaluado la mortalidad sobre unos ratones sometidos a una neumopatía por SASM ($7 \cdot 10^6$ CFU) realizada 2, 4, 8, 24, 48 y 96 después de la hemorragia (HP-H2, -H4, -H8, -H24, -H48 y -H96, respectivamente) y comparada con un grupo de ratones sometidos a una neumopatía por SASM sola (grupo P). Cada grupo comprendía 15 animales. (*significativamente diferente del grupo P después de la corrección de Bonferroni).

- Figura 2: Representación esquemática de los 3 grupos del estudio principal. C, grupo control; P, grupo neumonía; HP, grupo hemorragia neumonía.

- Figura 3: El choque hemorrágico agrava la pérdida de peso y las consecuencias biológicas de una neumopatía por SASM.

  Los datos se expresan en promedios +/- SEM y son representativos de tres experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico.

  A. Los ratones se pesaron todos los días durante 5 días (120 horas). Cada grupo comprendía 10 ratones. (& p ≤ 0,001 frente al grupo C, * p ≤ 0,01 frente al grupo P). **B.** Las muestras sanguíneas se extrajeron en la aurícula derecha 24 horas después del inicio de la neumopatía. Cada grupo comprendía 5 animales. (* p ≤ 0,05 frente al grupo C, & p ≤ 0,05 frente al grupo P).

- Figura 4: La IS post-hemorrágica induce a unas bacteriemias durante una neumopatía por SASM.

  Los animales se sacrificaron 12, 24 y 48 horas después del principio de la neumopatía. Los recuentos de las colonias de SASM en los pulmones y en el bazo se realizaron después del cultivo sobre un medio selectivo. Los datos presentados incluyen 15 ratones por grupo que agrupan 3 experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. (* p ≤ 0,05 frente a cualquiera de los otros; & p ≤ 0,05 frente al grupo P en el tiempo indicado).

  Evolución local (A) y simétrica (B.C.) del inóculo bacteriano. Los datos representados son unos promedios ±

SEM **(A.,B.)** o unos porcentajes ± SEM **(C.).** El límite de detección del procedimiento era de 0,7 UFC por gramo de tejido.

- Figura 5: La IS post-hemorrágica acentúa las lesiones histológicas de una neumopatía por SASM.

Se han estudiado cuatro grupos de ratones: Sin tratamiento, control (grupo C); neumopatía por SASM sola (grupo P) y hemorragia seguida de una neumopatía por SASM (grupo HP). Los tejidos fijados en el formol se acoplaron y después tiñeron por hematoxilina y eosina antes del análisis microscópico *(aumento x 20).*

Aspecto histológico representativo de los pulmones de **(A.)** ratones sin tratamiento que tienen un pulmón sano; **(B)** ratones del grupo control a la 24ª hora. El parénquima pulmonar se presenta después por una serie de imágenes obtenidas sobre unos animales a diferentes tiempos de la neumopatía: 12, 24, 96 y 168 horas **(C.E.G.I.)** para el grupo P; y **(D.F.H.J)** para el grupo HP. Los agregados de células inmunes aparecen a partir de la 12ª hora de la infección (flechas) y eran más numerosos en el grupo HP que en el grupo P en todos los plazos.

- Figura 6: La IS post-hemorrágica agrava las lesiones inflamatorias de una neumopatía por SASM

Cada grupo de ratones comprendía 5 animales. Los datos son expresados en media ± 25-75º percentiles y son representativos de tres experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. (* $p \leq 0,05$).

A. Acumulación de polinucleares neutrófilos en los pulmones. La actividad mieloperoxidásica (MPO) se midió en los dos pulmones.

B. Lesiones pulmonares endoteliales. La permeabilidad endotelial se determinó mediante la medición del porcentaje de albúmina FITC que pasa a través de los capilares pulmonares.

C.D.E. Concentraciones pulmonares de las citoquinas. Las concentraciones en TNF alfa **(C.),** IL-1 beta **(D.)** y MIP-2 **(E.)** se midieron en los triturados de pulmones.

- Figura 7: La IS post-hemorrágica incrementa la hiporreactividad sanguínea al LPS durante una neumopatía por SASM.

Se ha cultivado una muestra de sangre total durante 24 horas con LPS procedente de *E.coli O111B4* y se han medido las citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares. Cada grupo comprendía 5 animales. Los datos se han expresado en media ± 25-75º percentiles y son representativos de tres experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. (* $p \leq 0,05$).

Las concentraciones en TNF alfa **(A.),** IL-1 beta **(B.)** y MIP-2 **(C.)** en los cultivos celulares no estimulados por LPS estaban todas por debajo del límite de detección de determinación.

- Figura 8: Número y estado de maduración de las células esplénicas $CD11C^{high}$ durante una neumopatía por SASM precedida o no de un choque hemorrágico. Cada grupo de ratones comprendía 6 animales. Los datos se expresaron en media ± 25-75º percentiles y son representativos de dos experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. (** $p \leq 0,01$).

A. Numeración de las células $CD11c^{high}$ en el bazo. En cada grupo, la suspensión celular obtenida por digestión enzimática de los bazos ha dado lugar a una numeración, después se ha determinado el porcentaje de células $CD11c^{high}$ por FACS. El número absoluto de células $CD11c^{high}$ se ha calculado entonces.

B. Expresión de los marcadores de maduración de $CD11c^{high}$. Los marcadores membranarios siguientes se analizaron por FACS: CMH-Clase II, CD40, CD80, CD86.

- Figura 9: La IS post-hemorrágica disminuye la transcripción: (A.) de una citoquinas dependiente de Nuclear Factor-kB (NF-kB), (B.) de una citoquina dependiente del interferón Regulatory Factor (IRF-7), (C.) de la interleucina (IL-10) y (D.) de la IL-12 en las CD esplénicas después de una neumopatía por SASM.

Cada grupo de ratones comprendía 6 animales. Los datos se expresan en media ± 25-75º percentiles y son representativos de dos experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

A. B. C. D. Análisis en RT-PCR cuantitativa de **(A.)** Tumor Necrosis Factor (TNF alfa) ARNm; **(B.)** Interferón (IFN beta) ARNm; **(C.)** IL-10 ARNm y **(D.)** IL-12 ARNm en las CD esplénicas. Los ARNm se han extraído de las células CD11 c+ seleccionadas positivamente de entre las suspensiones celulares

esplénicas.

- Figura 10: Alteraciones de los fenotipos de las subpoblaciones de células dendríticas relacionadas con la IS post-hemorrágica durante una neumopatía por SASM. Cada grupo de ratones comprendía 6 animales. Los datos se expresan en media ± 25-75º percentiles y son representativos de dos experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

  Número de células de cada subpoblación de CD esplénicas **(A.),** capacidades de presentación del antígeno y estado de maduración de pCD **(B.);** de CD convencionales cCD CD8+ (cCD CD8+) **(C.)** y cCD CD8- **(D.)** en el bazo después de una neumopatía por SASM.

  Numeración de subpoblación esplénica de CD. Las células se obtuvieron después de la digestión enzimática de los bazos. Un recuento sobre célula de Malassez y después la determinación del porcentaje de cada tipo celular se realizó por FACS. Las subpoblaciones de CD se definieron por sus marcadores membranarios siguientes: B220 y SyglecH para pCD, $CD11c^{high}$ y $CD8^{high}$ para cCD CD8+; $CD11c^{high}$ y $CD8^{low}$ para cCD CD8-. Expresión de los marcadores de maduración de los CD. Los marcadores membranarios siguientes se analizaron por FACS: CMH-Clase II, CD80, CD86 y CD40.

- Figura 11: La IS post-hemorrágica disminuye la capacidad de cCD para hacer proliferar unos linfocitos T durante una neumopatía por SASM.

  Cada subpoblación de CD se clasificó **(A.** CD no estimulados) y se cultivó *ex vivo* durante 24 horas con CpG 1826 (5µM): **(B.** CD estimuladas). Cada subpoblación se cultivó con unos linfocitos T CD4 y CD8 alogénicos durante 3 días (ratio CD/T: 1/25). La proliferación linfocitaria se midió mediante la incorporación celular de timidina en un periodo de 8 horas. Cada grupo comprendía un grupo de 5 animales. Los datos se expresan en media ± SEM y son representativos de dos experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. *pCD (barras cuadriculadas), cCD CD8- (barras de damero) y cCD CD8+ (barras grises).* (* p ≤ 0,05).

  A. Proliferación de los linfocitos T en contacto con CD no estimuladas.
  B. Proliferación de los linfocitos T en contacto con CD estimuladas 24 horas por CpG.

- Figura 12: Después del choque hemorrágico, un tratamiento por CpG-ODN previene el aumento de susceptibilidad de los animales a una neumopatía por SASM.

  Una inyección intravenosa de CpG-ODN 1668 (100 µl a 100 µmol) (grupo HP-CpG) o de mismo volumen de suero salado isotónico (grupo HP) se ha realizado inmediatamente después de la reanimación del choque hemorrágico. Veinticuatro horas más tarde, los ratones se inocularon con 7 x 10^6 CFU de SASM. La tasa de supervivencia de cada grupo se midió dos veces por día durante 7 días (168 horas). Cada grupo comprendía 8 animales. Los datos se han representado en porcentajes y son representativos de tres experimentos independientes, teniendo cada uno el mismo significado estadístico. (* p ≤ 0,05). Grupo HP (rombos negros), grupo HP-CpG (cuadrados vacíos).

La presente invención se entenderá mejor a la luz de los ejemplos siguientes que se basan en las figuras presentadas anteriormente. Estos ejemplos son proporcionados en la presente memoria a título puramente ilustrativo y no limitan de ninguna manera el objeto de la presente invención.

Ejemplos

1 Materiales y métodos

1.1. Animales

Se han obtenido unos ratones machos Balb/cJ (20-24 gramos) del criadero Janvier (Laval, Francia). Los ratones se mantuvieron sobre un ciclo día/noche de 12 horas con libre acceso al agua y comida. Todas las manipulaciones se llevaron a cabo de acuerdo con los principios de cuidados de animales de laboratorios (NIH publicación Nº86-23, modificada en 1985). Se definieron tres grupos: control (grupo C) que consiste en una punción cardiaca seguida de una instilación estéril endo-traqueal; Neumopatía (grupo P) que consiste en una en neumopatía sola; y hemorragia-Neumopatía (grupo HP) que consiste en un politraumatismo (en este caso, un choque hemorrágico) reanimado seguido de una neumopatía.

1.2. Procedimiento de realización del choque hemorrágico

Se ha utilizado un modelo murino de choque hemorrágico de volumen controlado reanimado validado en la bibliografía (Asehnoune *et al*. 2006 (A y B); Asehnoune *et al*. 2005; Robinson *et al*. 1991). Los animales se han anestesiado con 1,5 ml de Isoflurane® (Baxter, Francia). Se realizó una punción cardiaca trans-torácica con una

aguja de calibre 29 para extraer en 45 segundos un 30% de la masa sanguínea (0,3 ml de sangre/10 g de peso de cuerpo). La sangre se extrajo en una jeringa heparinada (heparinato de sodio, 5U) y conservada bajo agitación a 37℃ durante 60 minutos. Después, el volumen de san gre se restituyó en el plexo venoso retro-orbital.

1.3. Procedimiento de realización de la neumopatía con Staphylococcus aureus

Se ha cultivado una cepa de *Staphyloccocus aureus* sensible a meticilina o "SASM" (cepa ATCC 29213) durante 16 horas a 37℃ en un medio tríptico soja (Grosseron, Saint Herblain, Francia). Inmediatamente antes de la utilización, los cultivos se lavaron dos veces (centrifugados durante 10 minutos a 1000 g) y diluidos en suero salado isotónico estéril para ser calibrados por espectroscopía. La concentración bacteriana se controló sistemáticamente por cultivo cuantitativo.

Los ratones se anestesiaron por Isoflurane® (Baxter, Francia), y se colocaron en decúbito dorsal. Se utilizó una aguja de nutrición enteral (calibre 24) para el cateterismo de la tráquea y la inyección de 70 µl de solución bacteriana. Los ratones se suspendieron entonces durante 30 segundos por los incisivos para mejorar la penetración del inóculo. La tasa de instilación intratraqueal alcanzaba un 100%.

1.4. Seguimiento clínico

Se evaluó la mortalidad dos veces por día durante 7 días. Se pesaron los ratones una vez por día durante 5 días. Se midió la glicemia capilar por un hemaglucotest (Boehringer Ingelheim Francia). Se midió la gasometría venosa, reflejo de la intensidad del choque y de la calidad de su reanimación, sobre sangre venosa central extraída de la aurícula derecha.

1.5. Medición de la diseminación bacteriana de la infección

Después del sacrificio, los pulmones y el bazo de los animales se homogeneizaron mecánicamente de manera estéril. Los homogeneizados se sometieron a una serie de diluciones al 1/10 y se cultivaron a 37℃ sob re medio selectivo Chapman (Grosseron, Saint Herblain, Francia). Después de 48 horas de incubación, se contaron las colonias bacterianas y los resultados se expresaron en log10 Unidad Formadora de Colonias (CFU) por gramo de órgano. Se utilizó el "staphylo slide reactif" (Biorad, Francia) para diferenciar *S. aureus* de *S.* no *aureus.*

1.6. Análisis histológico

Se extrajeron los pulmones e inmediatamente se colocaron en formol al 4%. Los tejidos fijados se recortaron y después tiñeron por hematoxilina y eosina antes del análisis microscópico.

1.7. Medición de la actividad mieloperoxidásica

Como se ha descrito anteriormente en la bibliografía (Kim *et al*. 2005), después de la extracción, los pulmones se pesaron y después se homogeneizaron mecánicamente a +4℃ durante 25 segundos en 1 ml de tampón (fosfat o de potasio a 50 mM con du N-etilmaleimida (10 mM), pH=6). El homogenizado proteico se lavó dos veces en el mismo tampón helado. Antes de la sonicación sobre hielo (180 segundos), se suspendió el residuo proteico en 1 ml de fosfato de potasio (50 mM, pH=6) que contiene un 0,5% de hexadeciltrimetilamonio. Después de un choque térmico de 2 horas a +56℃, se determinó la actividad mielo peroxidásica del sobrenadante por medición del poder de oxidación dependiente del agua oxigenada de o-ianisida (Kim *et al.* 2005).

1.8. Medición de la permeabilidad endotelial pulmonar

Como se ha descrito anteriormente (Boutoille *et al*. 2009), la albúmina marcada con fluoresceína isotiocianato (albúmina FITC, Sigma, Alemania) se ha utilizado para medir la permeabilidad pulmonar endotelial. Dos horas después de una inyección intraperitoneal de 2 mg de albúmina FITC, se eutanisarón los ratones por exsanguinación. Se extrajeron entonces los pulmones, se homogeneizaron mecánicamente en 1 ml de suero salado isotónico y después se centrifugaron (4000 g durante 10 minutos). La sangre se centrifugó durante 10 minutos a 4000 g para recuperar el plasma. La medición de la cantidad de albúmina FITC se realizó por fluorimetría (excitación 487 nm y emisión 520 nm) en el plasma y el triturado pulmonar. La permeabilidad endotelial pulmonar se calculó entonces según la fórmula validada siguiente:

$$\text{Perm-FITC (\%)} = (((FL_{HS} - FL_N) \times W_H) - QFB) / ((F_{BS} - F_{BN}) \times We \times 0.07 \times (1 - Hte))$$

en la que FL_{HS} es la fluorescencia del sobrenadante pulmonar; FL_N es la fluorescencia natural de este sobrenadante medida sin albúmina-FITC; F_{BS} es la fluorescencia del plasma; We x 0,07 x (1 - Hte) es el volumen plasmático (We: peso de los ratones; Hte: hematocrito); F_{BN} es la fluorescencia natural del plasma medida sin administración de

albúmina-FITC; W_H es el peso de los pulmones; QFB, que es la proporción de fluorescencia que corresponde a la sangre intrapulmonar residual, se calcula de la siguiente manera:

$$(QFB = ((FL_{HS} - FL_N) \times Hb_{HS}) / Hb)$$

en la que Hb_{HS} es la tasa residual de hemoglobina en el sobrenadante pulmonar y Hg es la hemoglobina del ratón antes del sacrificio.

1.9. Preparación de los homogeneizados pulmonares para el análisis de las citoquinas por el procedimiento ELISA

Los pulmones se homogeneizaron en un tampón helado (1 X PBS, pH 7,4, 0,1 % Triton X-100) que contiene 1 mM de inhibidor de proteasas (Sigma, Francia) (24). Los sobrenadantes obtenidos después de la centrifugación a +4℃ durante 20 minutos a 12000 g se conservaron a -80℃ hasta el análisis. La concentración proteica de cada muestra se determinó por el kit de medición proteica micro-BCA con estandarización con albumina sérica bovina (Pierce, Inglaterra).

1.10. Cultivo celular para medición de la reactividad sanguínea con LPS

Se extrajo una muestra de 0,5 ml de sangre durante el sacrificio de los animales. La muestra se diluyo al 1/5 en RPMI-1640 (Laboratoire de biotechnologies, Reims) con suplementación en penicilina/estreptomicina. La sangre se diluyó, se cultivaron 500 µl por pocillo, sin o con LPS (*Escherichia coli* O111:B4 a 1 µg/ml) a 37,0℃ en una estufa al 5% de CO2 (20). El sobrenadante de los cultivos celulares se centrifugó a 12000 g durante 2 minutos y se conservó a -80℃ antes de la dosificación ELISA. Las concentraciones de TNFalfa, de interleucina (IL)-1β y de la proteína inflamatoria del macrófago-2 (MIP-2) se cuantificaron por ELISA según las instrucciones del proveedor (R&D Systems, Francia).

1.11. Aislamiento de las células CD11c positivas esplénicas

Se digirieron las ratas por colagenasa D (Roche Diagnostic, Alemania) en RPMI 1640/1% suero fetal de ternera durante 25 minutos a 37℃. Se añadió EDTA a 10 mM para los 5 últimos minutos antes de la filtración (80 µm). Las células se lavaron en PBS antes de la incubación durante 15 minutos a +4℃ con un anticuerpo anti-ratones anti CD11c acoplado a una bola metálica. Después del lavado, la suspensión celular se enriqueció en células $CD11c^+$ por selección positiva sobre columna de separación MACS (Miltenyi, Francia). La pureza de las células $CD11c^+$ alcanzaba rutinariamente del 85 al 95%.

1.12. Reacción de polimerasa en cadena con transcripción inversa en tiempo real (Real Time RT-PCR)

El ARN total de las células CD11 c+ esplénicas se aisló con TRIzol (Invitrogen, Francia) y se trató durante 45 minutos a 37℃ con 2 U de RQ1 ADNasa (Promega, Francia). Un microgramo de ARN sufrió una retrotranscripción con Superscript III transcriptasa inversa (Invitrogen). Se sometió un microlitro de solución de ADN complementario a una PCR cuantitativa en tiempo real en un sistema BioRad iCycler iQ utilizando el QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Francia). La PCR cuantitativa consistía en 45 ciclos de 30 segundos a 95℃ seguido de 30 segundos a 60℃. Las secuencias de los cebadores para el TNFalfa, el interferón beta (IFNbeta), la IL-10, la IL-12 y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se seleccionaron gracias al programa "pick primer" de NCBI (tabla 1).

Tabla 1: Secuencias de los cebadores para la RT-PCR cuantitativa

Cebador	**Cebador directo (5'-3')**	**Cebador inverso (3'-5')**
TNF alfa	*AAAGGGAGAGTGGTCAGGTTGC*	*GGCTGGCTCTGTGAGGAAGG*
IFN beta	*CCCTATGGAGATGACGGAGA*	*CTGTCTGCTGGTGGAGTTCA*
IL-10	*TGGCATGAGGATCAGCAGGG*	*GGCAGTCCGCAGCTCTAGG*
IL-12p40	*TGTGGAATGGCGTCTCTGTCTG*	*CAGTTCAATGGGCAGGGTCTCC*
GAPDH	*ACCACAGTCCATGCCATCAC*	*ACCTTGCCCACAGCCTTG*

La expresión de GAPDH se utilizó como referencia para normalizar el nivel de expresión de cada gen. La expresión génica cuantitativa se calculó con el procedimiento de 2-ΔΔCt utilizando las células CD11c+ esplénicas de los ratones control como calibrador (Livak *et al.* 2001).

1.13. Análisis por FACS

El número total de células esplénicas vivas en suspensión (PBS-suero fetal de ternera-Azida) se completó sobre células de Malassez utilizando la exclusión de la eosina. Los anticuerpos anti-ratones procedentes de la rata utilizadas se obtuvieron a partir de la colección europea de cultivo celular. La mezcla de anticuerpos utilizada para excluir las células no dendríticas se obtuvieron de BD biosciences (Estados Unidos): CD3-PE, CD19-PE, TCRb-PE,

NK1.1-PE, Ter119-PE. Las subpoblaciones de CD se caracterizaron por los anticuerpos siguientes: SiglecH-APC Biosciences (Estados Unidos), CD11 c-PECy7, CD8-FITC, B220-PerCPCy5.5. La maduración de CD se apreció por los anticuerpos biotinilados siguientes: anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40 y anti-CMH de clase II. La aspecificidad de los anticuerpos se midió mediante la adición de estreptavidina-APC Cianina 7 BD Biosciences (Estados Unidos): Se contaron un total de $4x10^6$ células para cada anticuerpo.

1.14. Cocultivo de linfocitos T/células dendríticas (Ouabed et al. 2008)

Las subpoblaciones de DC se clasificaron por FACS y se maduraron (CD estimuladas) o no (CD no estimuladas) 24 horas por CpG 1668 (Invivogen, Francia). Las CD se cultivaron después con unos linfocitos T CD4+ y CD8+ alogénicos en una placa de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo. Después de tres días de cultivo a 37℃ al 5% de CO_2, las células se pusieron durante 8 horas en contacto con 0,5 µCi de [3H]TdR (GE Healthcare) por pocillo. Las células se recogieron entonces sobre un filtro de fibras de vidrio para medir la incorporación de timidina por centelleo (Packard Institute).

1.15. Análisis estadístico

El programa GraphPad prism (GraphPad Software, San Diego, California) se utilizó para los análisis estadísticos. Las tasas de supervivencia se compararon mediante un ensayo de logrank. Las variables continuas no paramétricas se expresaron en promedio ± SEM o ± 25-75º percentiles y se compararon mediante un ensayo de Kruskall Wallis seguido de un Mann-Whitney. $p \leq 0,05$ era el límite de significatividad estadística.

2 Resultados

2.1. Estudio piloto: implementación de un modelo murino de inmunodepresión sistémica (IS) post-hemorrágica expuesto de manera secundaria a una neumopatía con S. aureus.

2.1.1 Efecto del inóculo y del intervalo de tiempo entre el choque hemorrágico y la neumopatía por SASM sobre la mortalidad

Con el objetivo de poner en evidencia los efectos de IS post-hemorrágica sobre la mortalidad, se realizó una neumopatía por SASM con $7 \cdot 10^5$, $7 \cdot 10^6$ y $7 \cdot 10^7$ UFC de *S. aureus* 24 horas después de la realización de un choque hemorrágico (grupo HP) y se comparó con la realización de una neumopatía sola (grupo P). La mortalidad era superior en el grupo HP comparada con el grupo P para los 2 inoculados más débiles (Figura 1.A.B). El inóculo superior conllevaba una mortalidad del 100% en los dos grupos (Figura 1.C.). Como la IS post-hemorrágica es un proceso dinámico, se ha evaluado la evolución en el tiempo de IS. Se realizó una neumopatía por SASM 2, 4, 8, 24, 48 o 96 horas después del choque hemorrágico (grupo HP-H2; -H4; -H8; H-24; H-48; H-96, respectivamente). Comparada con una neumopatía sola (grupo P), la tasa de supervivencia en el grupo HP disminuía significativamente con el aumento del plazo entre choque y neumopatía de 4 a 24 horas, y se observaba una recuperación progresiva para duraciones superiores (Figura 1.D). Un inóculo de *S. aureus* de $7 \cdot 10^6$ UFC (grupo P) y un plazo entre el choque hemorrágico y la neumopatía de 24 horas (grupo HP) eran los parámetros óptimos para el estudio de IS. Por lo tanto, se utilizaron para el estudio principal (Figura 2). En el grupo control (C), una punción cardiaca sin extracción sanguínea ni reanimación estaba seguida de una instilación intra-traqueal de suero salado estéril 24 horas más tarde. La hemorragia a volumen controlado se realizó por punción cardiaca (0,3 ml/10 g) seguida de una reinyección de la sangre extraída 60 minutos más tarde (grupo Hemorragia Neumopatía, HP). Veinticuatro horas después de la reanimación, se instilaron 70 µl, o bien $7 \cdot 10^6$ UFC de SASM (grupo Neumopatía, P y grupo HP), o bien de suero fisiológico estéril (grupo C) en la tráquea. Veinticuatro horas (salvo que se precise de otra manera) después de la infección, los ratones se eutanasiaron y realizaron las extracciones.

2.1.2 El choque hemorrágico agrava la pérdida de peso y las consecuencias biológicas de una neumopatía por SASM.

Se midieron también las consecuencias clínicas y biológicas de la IS post-hemorrágica sobre el devenir de la infección. Los ratones del grupo HP padecieron una mayor pérdida de peso (Figura 3.A), una acidosis metabólica más severa y una caída menos importante de la glucemia (Figura 3.B) que la del grupo P.

2.1.3. La IS post-hemorrágica induce unas bacteriemias durante una neumopatía por SASM.

La diseminación local y sistémica de la invención se evaluó 12, 24 y 48 horas después de la neumopatía con (grupo HP) y sin choque hemorrágico (grupo P). No se ha puesto en evidencia ningún SASM en los pulmones y el bazo de los ratones control (grupo C). El aclaramiento pulmonar bacteriano estaba sin alterar en el grupo HP en comparación con el grupo P (Figura 4.A). Por el contrario, la diseminación sistémica de la infección, evaluada por los cultivos de los triturados de bazos, aumentaba en intensidad en las horas 24 y 48 en el grupo HP comparado con el grupo P (Figura 4.B). Las bacteriemias eran también más frecuentes después de un choque hemorrágico a la hora 24ª y 48ª de la infección (Figura 4.C).

2.1.4. La IS post-hemorrágica agrava las lesiones pulmonares de una neumopatía por SASM.

Al no alterarse el aclaramiento pulmonar bacteriano durante la IS post-hemorrágica, se evaluó el aspecto histopatológico de los pulmones durante la infección. El tejido pulmonar sano se caracteriza por finos alvéolos ventilados bordeados de una capa unicelular de neumocitos. (Figura.5.A). Para los ratones control (grupo C), el tejido pulmonar parecía normal (Figura 5.B). En el grupo P, a partir de la hora 12ª y 24ª de la infección, se observaban unos agregados de células inmunitarias y un principio de destrucción alveolar con espesamiento de las paredes (figura 5.C.E.). La recuperación histológica con una aireación de los alvéolos empezaba en el 4º día y era completa en el 7º día (Figura 5.G.I). En el grupo HP, en cada tiempo (Figura 5.D.F.H.J), los agregados de células inmunitarias eran más numerosos y las lesiones alveolares más severas que en el grupo P. Las lesiones pulmonares aparecían más rápidamente y la recuperación era más prolongada en el grupo HP que en el grupo P.

Las lesiones histológicas de una neumopatía por SASM eran cualitativamente más severas después de un choque hemorrágico, con en particular un aumento de la afluencia de las células inmunes (macrófagos y polinucleares neutrófilos). La acumulación pulmonar de polinucleares neutrófilos se evaluó por lo tanto cuantitativamente determinando la actividad mieloperoxidásica del tejido pulmonar de los ratones. A las hora 24ª de la infección, la acumulación de polinucleares neutrófilos era más importante en el grupo HP que en el grupo P (Figura 6.A.). Los polinucleares producen unas especies radicalares del oxígeno en gran cantidad, éstas son fuente de lesiones endoteliales (Rivkind *et al*. 1991). Debido a la acumulación de estas células, se midió la permeabilidad endotelial pulmonar (reflejo del edema alveolar). Está en el grupo HP de manera más importante que en el grupo P (Figura 6.B). Por otro lado, las concentraciones pulmonares en citoquinas pro-inflamatorias (TNF alfa, IL-1 beta y MIP-2) aumentaban durante la infección (Figura 6.C.D.E) pero la de la IL-1 beta era más alta cuando la neumopatía iba precedida del choque hemorrágico (Figura 6.D.).

2.1.5. La IS post-hemorrágica eleva la hiporreactividad sanguínea al LPS durante una neumopatía por SASM

Como los inventores (Asehnoune *et al*. 2006A) y otros autores (Goebel *et al*. 2000; Spolarics *et al*. 2003) lo habían descrito anteriormente, la IS post-traumática se caracteriza por una bajada de la reactividad sanguínea al LPS de *E.coli O111B4.* Ya que el estudio de la secreción de citoquinas sobre la sangre total produce los mismos resultados que sobre los monocitos aislados (Damsgaard *et al*. 2009), los inventores han elegido, por razones técnicas relacionadas con su modelo murino, estudiar la hiporreactividad con LPS sobre sangre entera. La producción de TNF alfa, de IL-1 beta disminuía significativamente en el grupo HP en comparación con los grupos P y S (Figura 7.A.B.) mientras que la de MIP-2 disminuía también en los HP y P frente al Grupo C (Figura 7.C.).

2.2. Caracterización de los trastornos de la inmunidad innata relacionada con la IS post-hemorrágica durante una neumopatía por SASM.

Durante la respuesta del organismo a una infección, las células dendríticas aseguran la integración entre la inmunidad innata y adaptativa y tienen probablemente un papel crucial en la regulación de la disfunción inmune inducida por la hemorragia. La disminución de la expresión membranaria de HLA-DR sobre los monocitos circulantes es, de momento, el único marcador de inmunodepresión sistémica que ha dado resultados concordantes en términos de predicción de la aparición de una infección, de un síndrome y fallo multivisceral y de correlación con el pronóstico post-traumático en general sin que se haya demostrado ninguna relación de causalidad. En el modelo de IS post-hemorrágica descrito en este caso, la infección es más grave cuando está precedida de una hemorragia. El número y la función de las células dendríticas se compararon por lo tanto en función de la presencia (grupo HP) o no (grupo P) de un choque hemorrágico antes de la infección.

2.2.1. Número y maduración de las células CD11c^{high} esplénicas durante una remisión de una neumopatía por SASM precedida o no de un choque hemorrágico.

El número de células CD11c^{high}, que representan la mayoría de las CD en el bazo, disminuía durante la remisión de la infección, esté (grupo HP) o no (grupo P) precedida de un choque hemorrágico (Figura 8.A.). Las capacidades de presentación del antígeno se midieron por la expresión membranaria de las moléculas de presentación del antígeno (CMH de Clase 2), y de las moléculas de coestimulación (CD80 y CD86). Las expresiones membranarias de CMH de clase 2 y de CD80 disminuían durante la neumopatía por SASM en los dos grupos P y HP, mientras que la expresión membranaria de CD86 disminuía sólo cuando un choque hemorrágico se realizaba antes del principio de la infección (Figura 8.B.). La expresión membranaria de CD40, marcador de la maduración de CD, no modificaba en las condiciones del experimento (Figura 8.B.).

2.2.2. La IS post-hemorrágica disminuye la actividad transcripcional de las células CD11c^{+} durante una remisión de una neumopatía por SASM.

Las células CD11c^{+} comprenden el conjunto de CD murinas. Las tasas de ARNm de TNF alfa, de IFN beta y de IL-12 eran significativamente elevadas a la 6ª hora de la infección en el grupo P en comparación con el grupo C (Figura 9.A.B.C.). Este aumento no se observaba cuando la infección iba precedida de un choque hemorrágico (grupo HP) (Figura 9.A.B.C.). Para la IL-10, el nivel de ARNm caía en el grupo HP en comparación con el grupo C, mientras que

no cambiaba en caso de infección sola (Figura 9.D.).

2.2.3. La IS post-hemorrágica altera los fenotipos de las subpoblaciones de CD durante una neumopatía por SASM.

Se describen en la actualidad tres subpoblaciones principales de CD (Merad *et al*. 2009): las CD convencionales (cCD) que comprenden las cCD CD8+ y las cCD CD8-; las CD plasmacitoides (pCD). El número de cCD CD8- disminuía 24 horas después de la neumopatía, esté (grupo HP) o no (grupo P) precedida de un choque hemorrágico mientras que los números de cCD CD8+ y de pCD no se alteraban (Figura 10.A). En lo referente a las pCD, la hemorragia realizada antes de la neumopatía (grupo HP) conllevaba una disminución significativa de las capacidades de presentación del antígeno (expresión membranaria de CMH-Clase II, CD80 y CD86) comparado con la realización de una neumopatía sola (grupo P) y del grupo control (C). La maduración de las pCD, reflejada por la expresión de CD40, disminuía también por la infección con (grupo HP) o sin (grupo P) choque hemorrágico comparado con el grupo control (grupo C) (Figura 10.B.). En lo referente a las cCD CD8+, la maduración y las capacidades de presentación del antígeno disminuían ambas por la infección con (grupo HP) o sin (grupo P) choque hemorrágico comparado con el grupo control (grupo C, Figura 10.C.). En lo referente a las cCD CD8-, las capacidades de presentación del antígeno disminuían parcialmente (expresión membranaria de CMH-clase II y CD80) mientras que la maduración (expresión membranaria de CD40) no se alteraba en los animales infectados después del (grupo HP) o sin (grupo P) choque hemorrágico comparado con los animales control (grupo C, Figura 10.D.).

2.2.4. La IS post-hemorrágica disminuye la capacidad de cCD para hacer proliferar unos linfocitos T durante una neumopatía por SASM

El colapso de los marcadores membranarios estudiados por FACS durante una neumopatía con MSSA (grupo P) era tan importante en el modelo descrito en este caso que las posibilidades técnicas de puesta en evidencia de una diferencia durante la IS post-hemorrágica estaban limitadas. Para afinar la comprensión de los trastornos funcionales de las CD después del choque hemorrágico, se estudiaron las capacidades de cada subpoblación de CD para provocar la proliferación de los linfocitos sin (Figura 11.A.) y con (Figura 11.B.) maduración *ex vivo* de CD por CpG. El choque hemorrágico (grupo HP) disminuía drásticamente las capacidades de cCD (CD8+ y CD8-) para hacer proliferar unos linfocitos T, con y sin maduración por CpG comparado con una neumopatía sola (grupo P) (Figura 11.A.B.). no se observaba ninguna diferencia en la subpoblación de pCD (Figura 11.A.B.).

2.3. Efecto de un tratamiento preventivo por CPG-ODN o por MPLA sobre la sobremortalidad de una neumopatía por SASM en el presente modelo de IS post-hemorrágica.

Puesto que las tres subpoblaciones de CD se alteraban significativamente por IS post-hemorrágica, los inventores han ensayado la posibilidad de prevenir la sobremortalidad relacionada con este trastorno durante una neumopatía con MSSA mediante un tratamiento por agonista de TLR-9, el CpG-ODN que provoca *in vivo* la maduración de las CD en condiciones normales (Askew *et al*. 2000) o por un agonista de TLR-4, el MPLA que provoca la maduración de las CD convencionales *in vivo* (Mata-Haro *et al*. 2007). El CpG 1668 (CpG-ODN de tipo B, Invivogen, Francia), así como el MPLA (Invivogen, Francia), disminuían significativamente la mortalidad en el modelo descrito en este caso (Figura 12 y datos no mostrados). El CpG-ODN inactivo (control), que es un agonista de TLR-9 que no activa su receptor, no prevenía la mortalidad relacionada con la infección.

3 Observaciones complementarias

Los resultados presentados anteriormente confirman el papel crítico que tienen las alteraciones funcionales de las CD en las infecciones secundarias en la IS post-hemorrágica. Se muestra también que 1) la IS post-hemorrágica aumenta la mortalidad, la diseminación sistémica y las lesiones pulmonares de una neumopatía con *S. aureus*; 2) las principales subpoblaciones de CD se alteran en este trastorno; 3) un tratamiento preventivo por CpG inyectado durante la fase de reanimación del choque hemorrágico permite corregir la sobremortalidad de una neumopatía con *S. aureus* relacionada con la IS post-hemorrágica.

Referencias

Mathers *et al.* PloS Med. Noviembre de 2006; 3(11):e442.

Patton *et al.* Lancet. Septiembre de 2009; 374(9693):881-92.

Rincon-Ferrari *et al.* J Trauma. Diciembre de 2004; 57(6):1234-40.

Papia *et al.* J Trauma. Noviembre de 1999; 47(5):923-7.

SFAR, SRLF. The risk for and approaches to control nosocomial ionfections in ICUs: guidelines from SFAR/SRLF task force on nosocomial infections in ICUs reanimaiton. 2005; 14:463-71.

Keel *et al.* J Trauma. Septiembre de 1996; 41(3):430-7; discussion 7-8.

Ditschkowski *et al.* Ann Surg. Febrero de 1999; 229(2):246-54.

Stephan *et al.* J Surg Res. Junio de 1989; 46(6):553-6.

Wichmann *et al.* Crit Care Med. Agosto de 1998; 26(8):1372-8.

Asehnoune *et al.* Resuscitation. Enero de 2006A; 68(1):127-33.

Asehnoune *et al.* Cytokine. Mayo de 2006B;34(3-4):212-8.

Asehnoune *et al.* Ann Fr Anesth Reanim. Marzo de 2005; 24(3):255-9.

Robinson *et al.* Crit Care Med. Octubre de 1991;19(10):1285-93.

Kim *et al.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Mayo de 2005; 288(5):L958-65.

Boutoille *et al.* Exp Lung Res. Mayo de 2009; 35(4):263-71.

Livak *et al.* Method. Methods. Diciembre de 2001;25(4):402-8.

Ouabed *et al.* J Immunol. 1 de mayo de 2008; 180(9):5862-70.

Rivkind *et al.* Circ Shock. Enero de 1991; 33(1):48-62.

Goebel *et al.* Ann Surg. Febrero de 2000; 231 (2):253-61.

Spolarics *et al.* Crit Care Med. Junio de 2003;31(6):1722-9.

Damsgaard *et al.* J Immunol Methods. 30 de enero de 2009; 340(2):95-101.

Merad *et al.* Blood. 9 de abril de 2009; 113(15):3418-27.

Askew *et al.* J Immunol. 15 de diciembre de 2000;165(12):6889-95.

Mata-Haro *et al.* (2007) Science 316: 1628-1632.

Léonard *et al.* (2007) Clin. Cancer Res. 13:6168-6174.

Venet *et al.* (2007) Crit. Care Med. 35:1910-1917.

Cheadle *et al.* (1991) Am. J. Surg. 161:639-645.

Baker *et al.* (1974) J Trauma. 14:187-196.

Teasdale *et al.* (1974) Lancet 2: 81-84.

Osborn *et al.* Crit Care Med 2004:32(11):2234-40.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHU NANTES UNIVERSITE DE NANTES Asehnoune, Karim

<120> AGONISTAS DE LOS RECEPTORES TLR 4 Y 9 PARA PREVENIR LAS COMPLICACIONES SÉPTICAS DE LA INMUNODEPRESIÓN POST-TRAUMÁTICA EN LOS PACIENTES HOSPITALIZADOS POR TRAUMATISMOS SEVEROS

<130> 357288D28144

<150> FR0906372
<151> 2009-12-28

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador directo TNF alfa

<400> 1

aaagggagag tggtcaggtt gc 22

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador inverso TNF alfa

<400> 2

ggctggctct gtgaggaagg 20

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador directo IFN beta

<400> 3

ccctatggag atgacggaga 20

<210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador inverso IFN beta

<400> 4

ctgtctgctg gtggagttca 20

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador directo IL-10

<400> 5

tggcatgagg atcagcaggg 20

<210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador inverso IL-10

<400> 6

ggcagtccgc agctctagg 19

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador directo IL-12p40

<400> 7

tgtggaatgg cgtctctgtc tg 22

<210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador inverso IL-12p40

<400> 8

cagttcaatg ggcagggtct cc 22

<210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador directo GAPDH

<400> 9

accacagtcc atgccatcac 20

<210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador inverso GAPDH

<400> 10

accttgccca cagccttg 18

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un agonista del receptor de tipo Toll 4 (TLR 4), para su utilización en el tratamiento profiláctico de complicaciones sépticas de la inmunodepresión sistémica post-traumática en un paciente hospitalizado que padece uno o varios traumatismos severos, siendo dicho agonista seleccionado de entre el lípido A monofosforilo (MPLA) y el lípido A monofosforilo 3-O desacilado (3D-MPLA).

2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que dicha inmunodepresión se caracteriza por:

a) una disminución del nivel de la producción *ex vivo* de citoquinas pro-inflamatorias inducidas por unos leucocitos sanguíneos después de la estimulación por LPS de bacilos gram negativos, con respecto al nivel de producción observado para un individuo sano; y/o

b) una disminución del nivel de expresión de HLA-DR sobre las células presentadoras de los antígenos de dicho paciente, con respecto al nivel de expresión observado para un individuo sano.

3. Composición según la reivindicación 2, caracterizada por que el nivel de expresión de HLA-DR sobre los monocitos de dicho paciente en las 24 horas después del o de los traumatismos disminuye con respecto al nivel de expresión observado para un individuo sano.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que dichas complicaciones sépticas son unas infecciones nosocomiales, preferentemente bacterianas.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada por que dicho paciente traumatizado presenta por lo menos dos lesiones traumáticas de entre las cuales por lo menos una lesión compromete el pronóstico vital.

6. Composición según la reivindicación 5, caracterizada por que dicho paciente traumatizado presenta un resultado de gravedad de las lesiones (ISS) de por lo menos 16 y/o un traumatismo craneal severo definido por un resultado de Glasgow (CGS) inferior a 8.

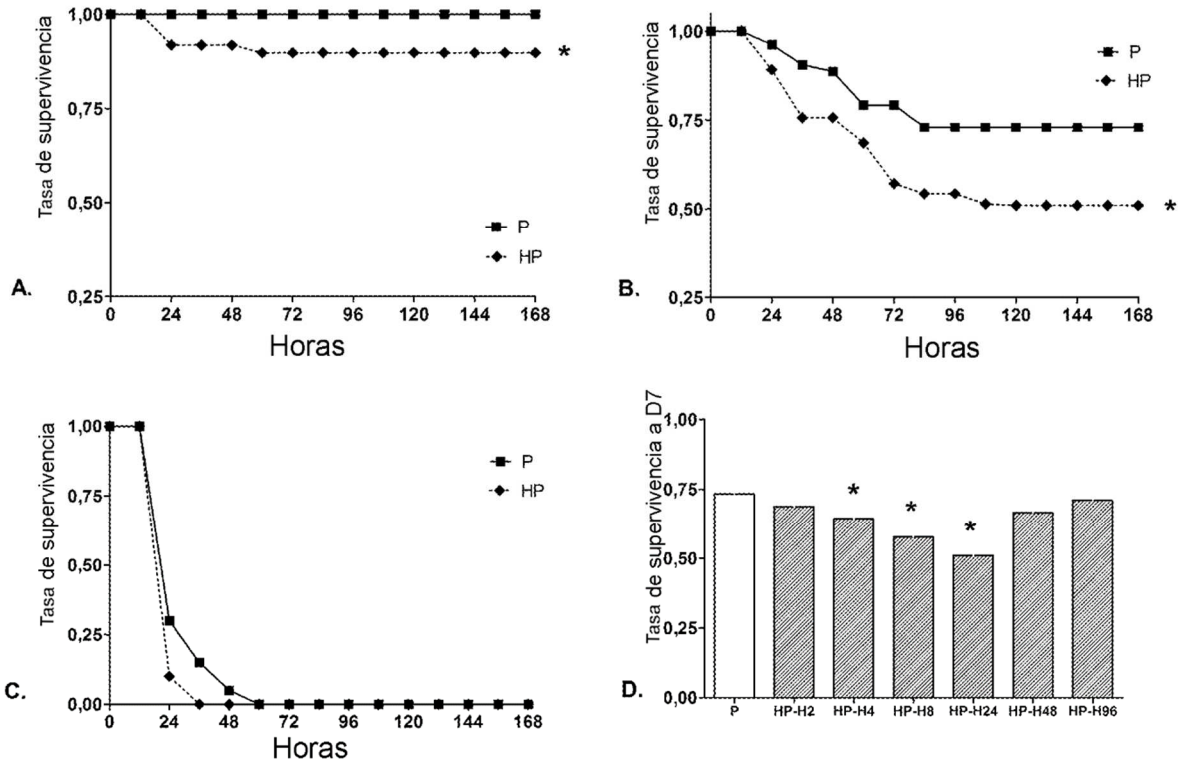

A.
Tasa de supervivencia
1,00
0,75
0,50
0,25
0
24
48
72
96
120
144
168
Horas
P
HP
*
B.
Tasa de supervivencia
1,00
0,75
0,50
0,25
0
24
48
72
96
120
144
168
Horas
P
HP
*
C.
Tasa de supervivencia
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
0
24
48
72
96
120
144
168
Horas
P
HP
D.
Tasa de supervivencia a D7
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
P
HP-H2
HP-H4
HP-H8
HP-H24
HP-H48
HP-H96
*
*
*

Figura 1

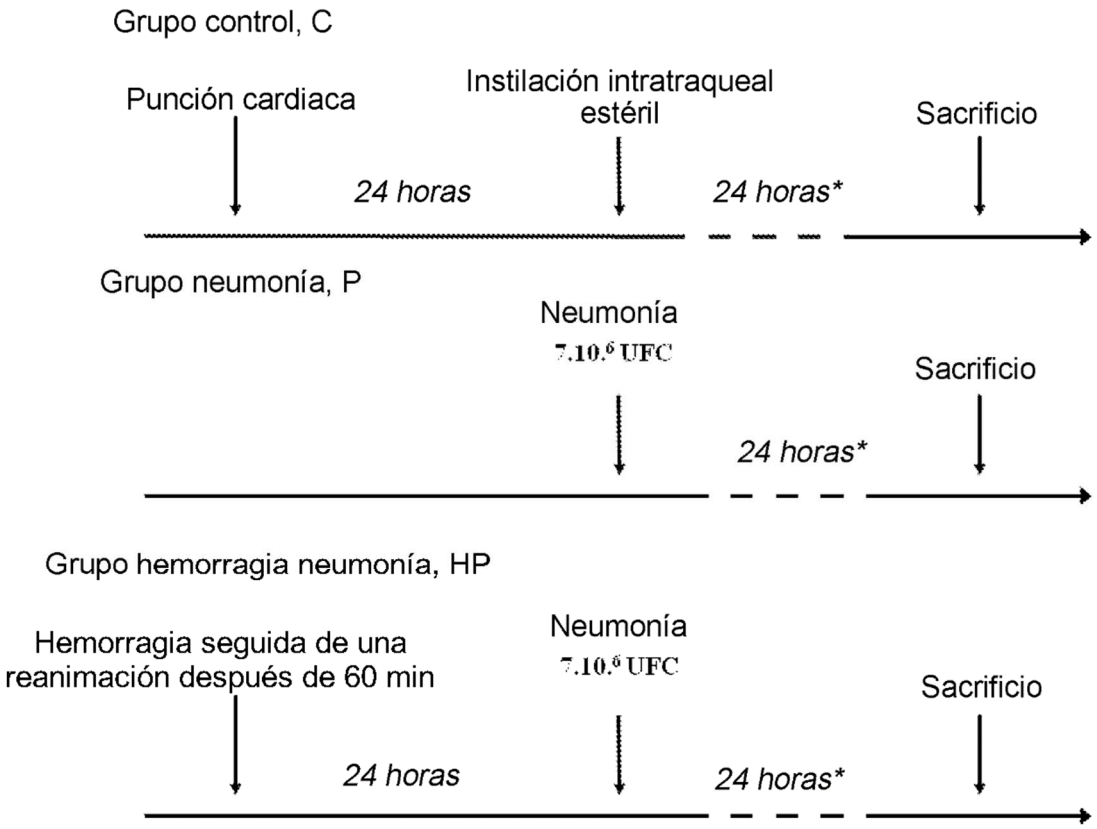
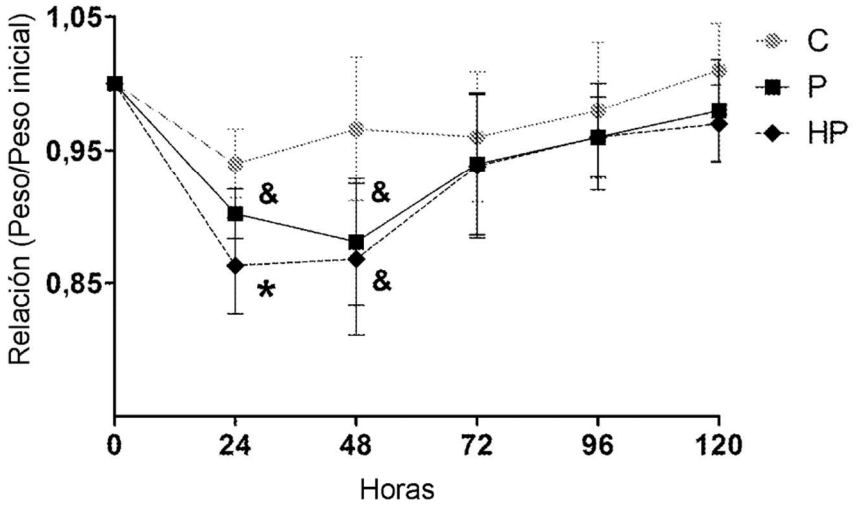

Grupo control, C
Punción cardiaca
Instilación intratraqueal estéril
Sacrificio
24 horas
24 horas*
Grupo neumonía, P
Neumonía
7.10.6 UFC
Sacrificio
24 horas*
Grupo hemorragia neumonía, HP
Hemorragia seguida de una reanimación después de 60 min
Neumonía
7.10.6 UFC
Sacrificio
24 horas
24 horas*

Figura 2

A.



B.

	Control	Neumopatía	Hemorragia-neumopatía
Lactato **(mmol/l)**	*3,5±0,5*	*4,6±1,3* *	*6,0±1,5* *&
pH	*7,34±0,03*	*7,26±0,03* *	*7,22±0,01* *&
HCO3- (mmol/l)	*28,5±1,1*	*26,8±1,6*	*24,5±3,0* * &
BE (mmol/l)	*+0,4±0,2*	*-0,9±0,8*	*-2,8±0,7* *&
PcO2 (kPa)	*6,4±1,1*	*3,4±1,2* *	*3,8±1,3* *
PcCO2 (kPa)	*7,3±0,9*	*8,5±0,7*	*9,1±1,3*
SvO2 (%)	*59±12*	*29±18* *	*35±19* *
Glicemia **(mmol/l)**	*1,87±0,29*	*0,81±0,3* *	*1,36±0,23* *&

Figura 3

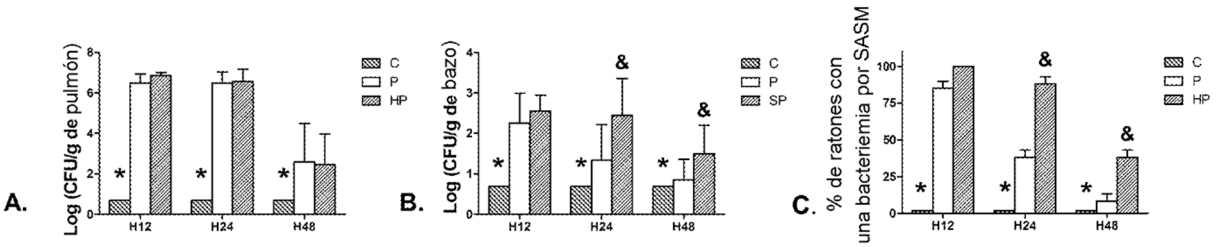


Figura 4

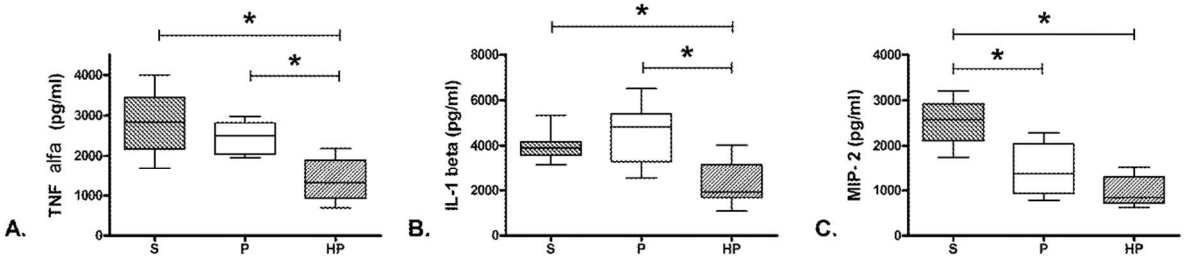


Figura 7

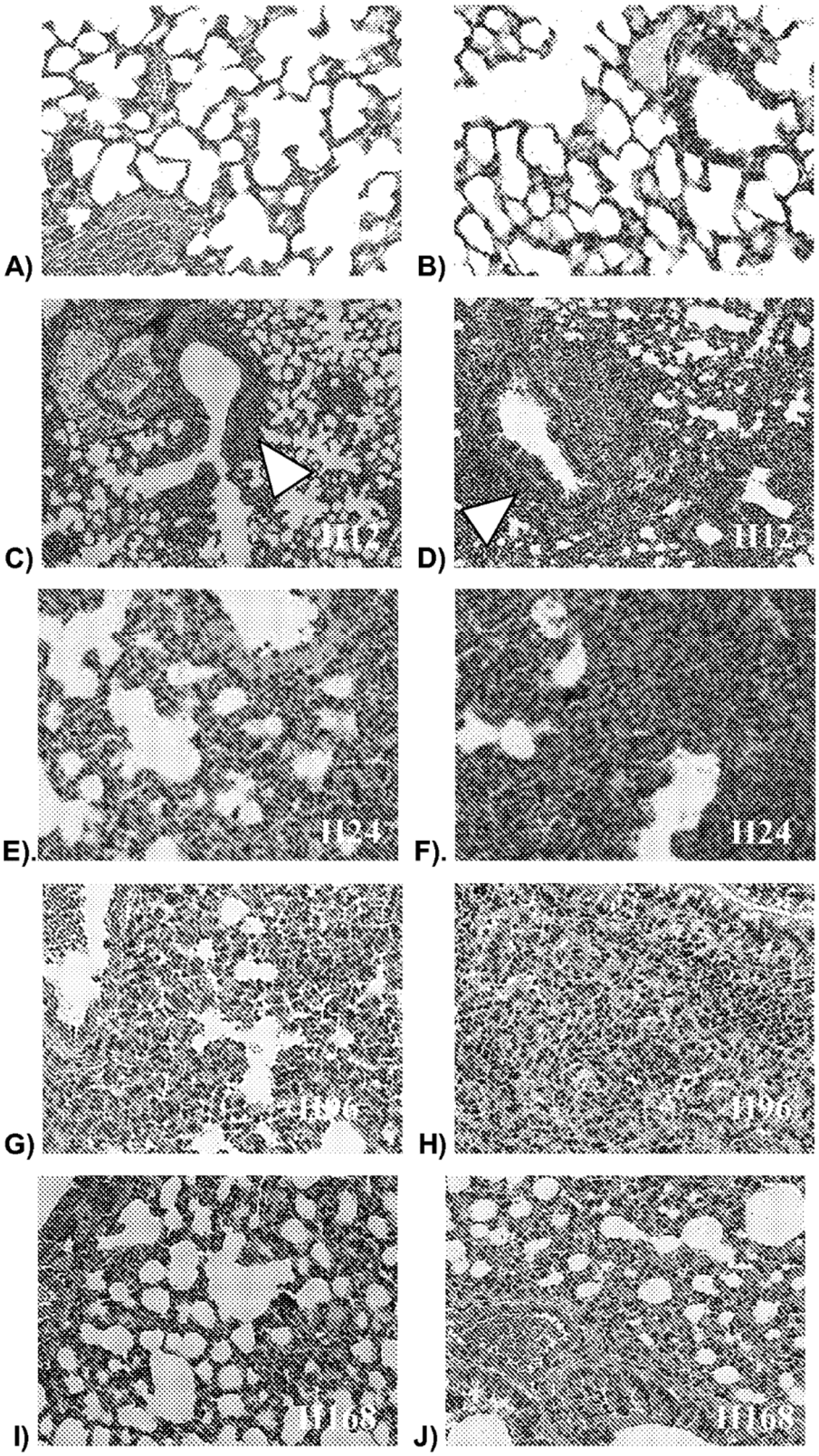


Figura 5

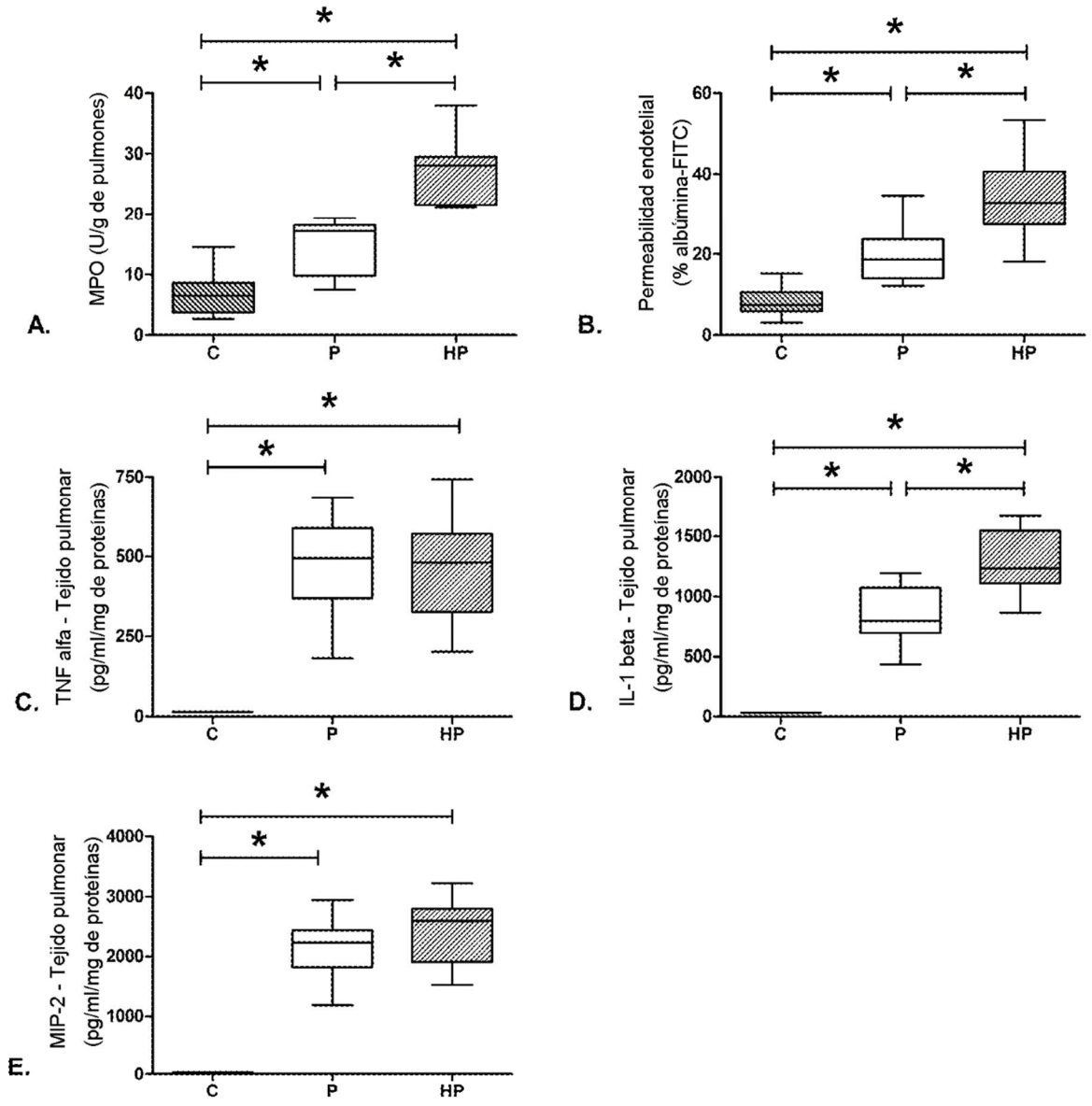
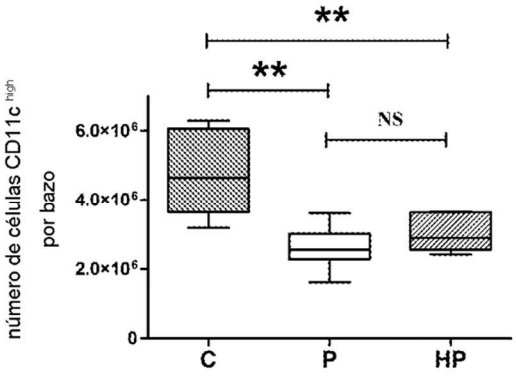

A.
MPO (U/g de pulmones)
0
10
20
30
40
C
P
HP
*
B.
Permeabilidad endotelial
(% albúmina-FITC)
0
20
40
60
C
P
HP
*
C.
TNF alfa - Tejido pulmonar
(pg/ml/mg de proteínas)
0
250
500
750
C
P
HP
*
D.
IL-1 beta - Tejido pulmonar
(pg/ml/mg de proteínas)
0
500
1000
1500
2000
C
P
HP
*
E.
MIP-2 - Tejido pulmonar
(pg/ml/mg de proteínas)
0
1000
2000
3000
4000
C
P
HP
*

Figura 6

A.


**
**
NS
número de células CD11c high por bazo
6.0×10⁶
4.0×10⁶
2.0×10⁶
0
C
P
HP

B.

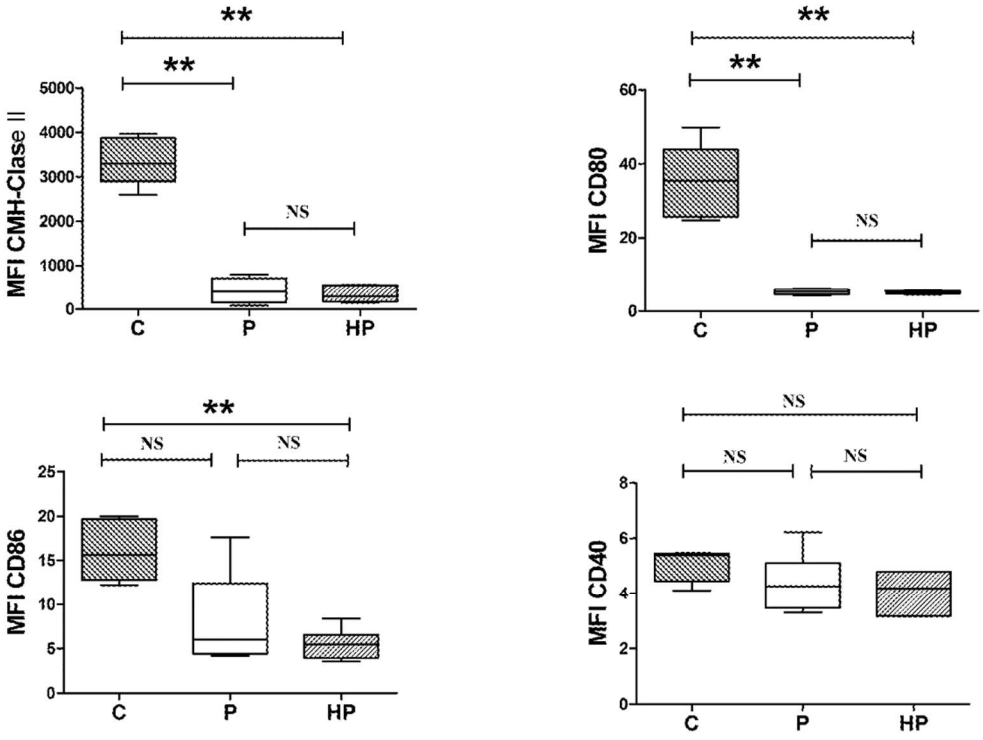

**
**
NS
MFI CMH-Clase II
5000
4000
3000
2000
1000
0
C
P
HP
**
**
NS
MFI CD80
60
40
20
0
C
P
HP
**
NS
NS
MFI CD86
25
20
15
10
5
0
C
P
HP
NS
NS
NS
MFI CD40
8
6
4
2
0
C
P
HP

Figura 8

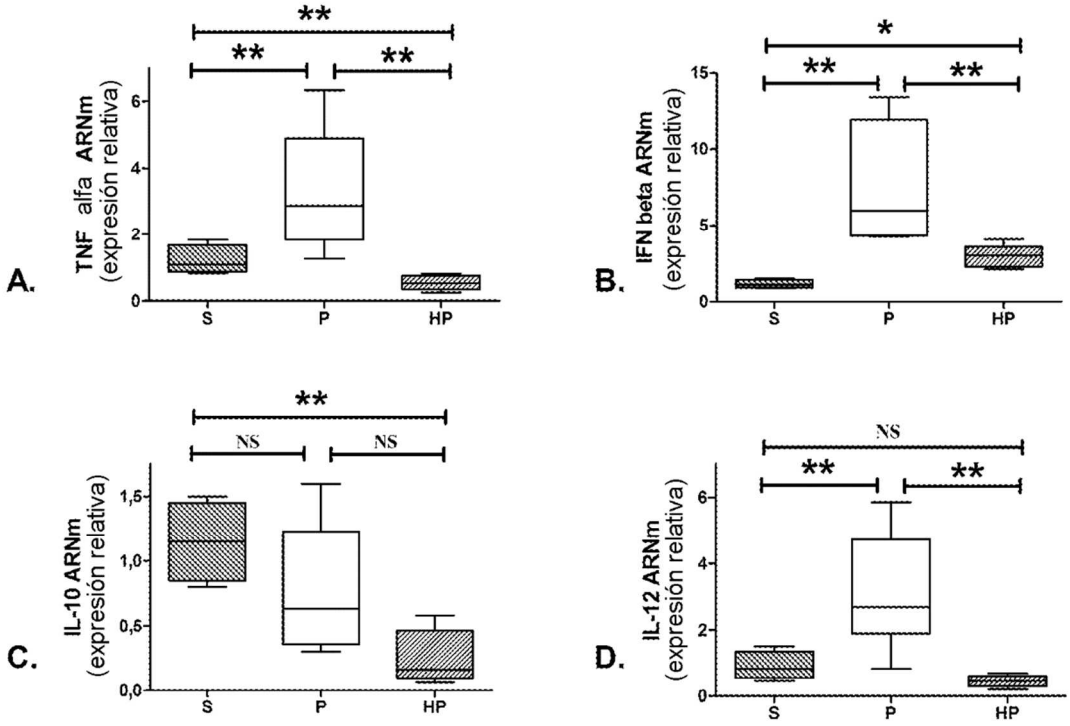

A.
TNF alfa ARNm
(expresión relativa)
**
**
**
0
2
4
6
S
P
HP
B.
IFN beta ARNm
(expresión relativa)
*
**
**
0
5
10
15
S
P
HP
C.
IL-10 ARNm
(expresión relativa)
**
NS
NS
0,0
0,5
1,0
1,5
S
P
HP
D.
IL-12 ARNm
(expresión relativa)
NS
**
**
0
2
4
6
S
P
HP

Figura 9

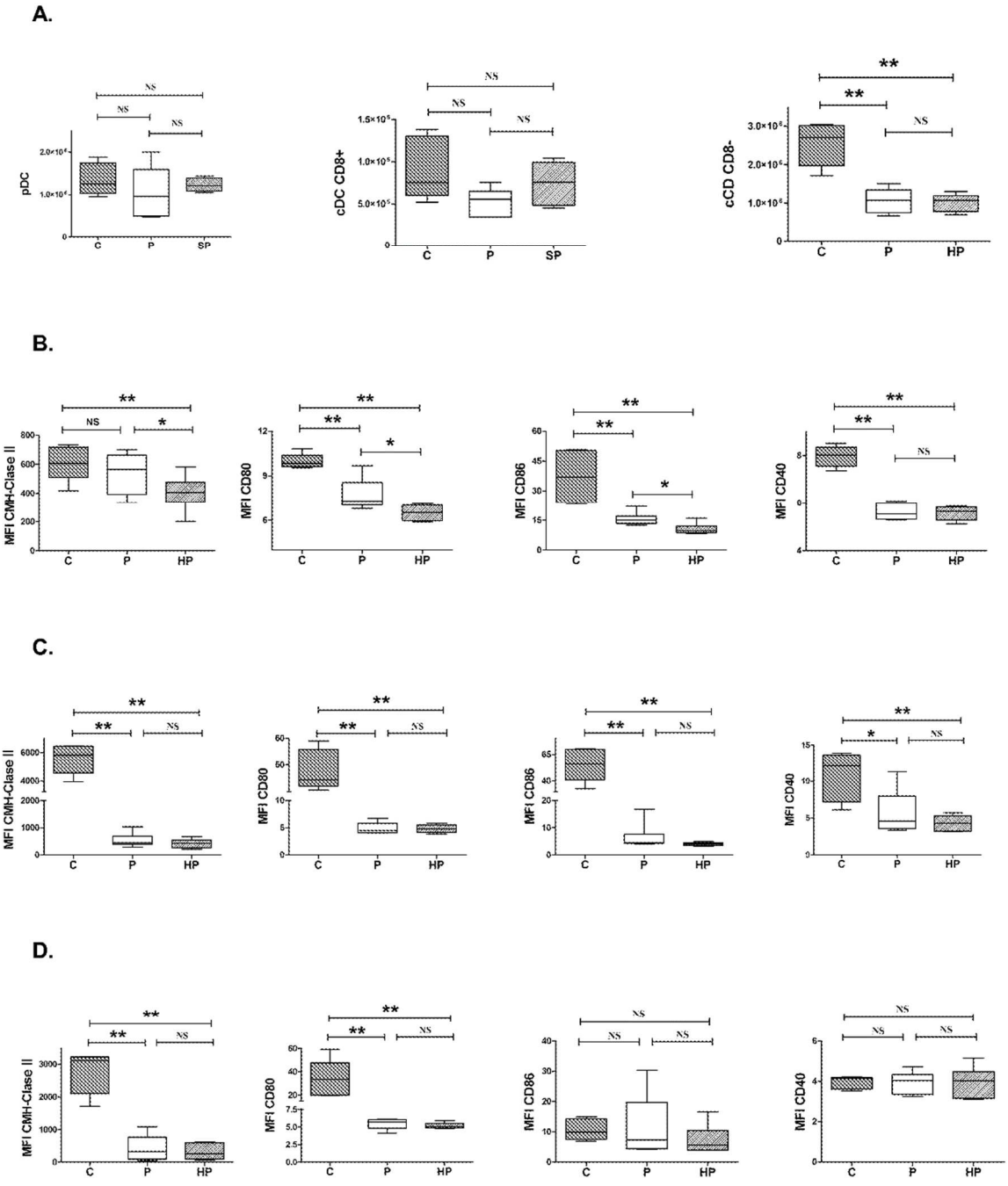

A.
pDC
cDC CD8+
cCD CD8-
B.
MFI CMH-Clase II
MFI CD80
MFI CD86
MFI CD40
C.
MFI CMH-Clase II
MFI CD80
MFI CD86
MFI CD40
D.
MFI CMH-Clase II
MFI CD80
MFI CD86
MFI CD40
C
P
SP
HP
NS

Figura 10

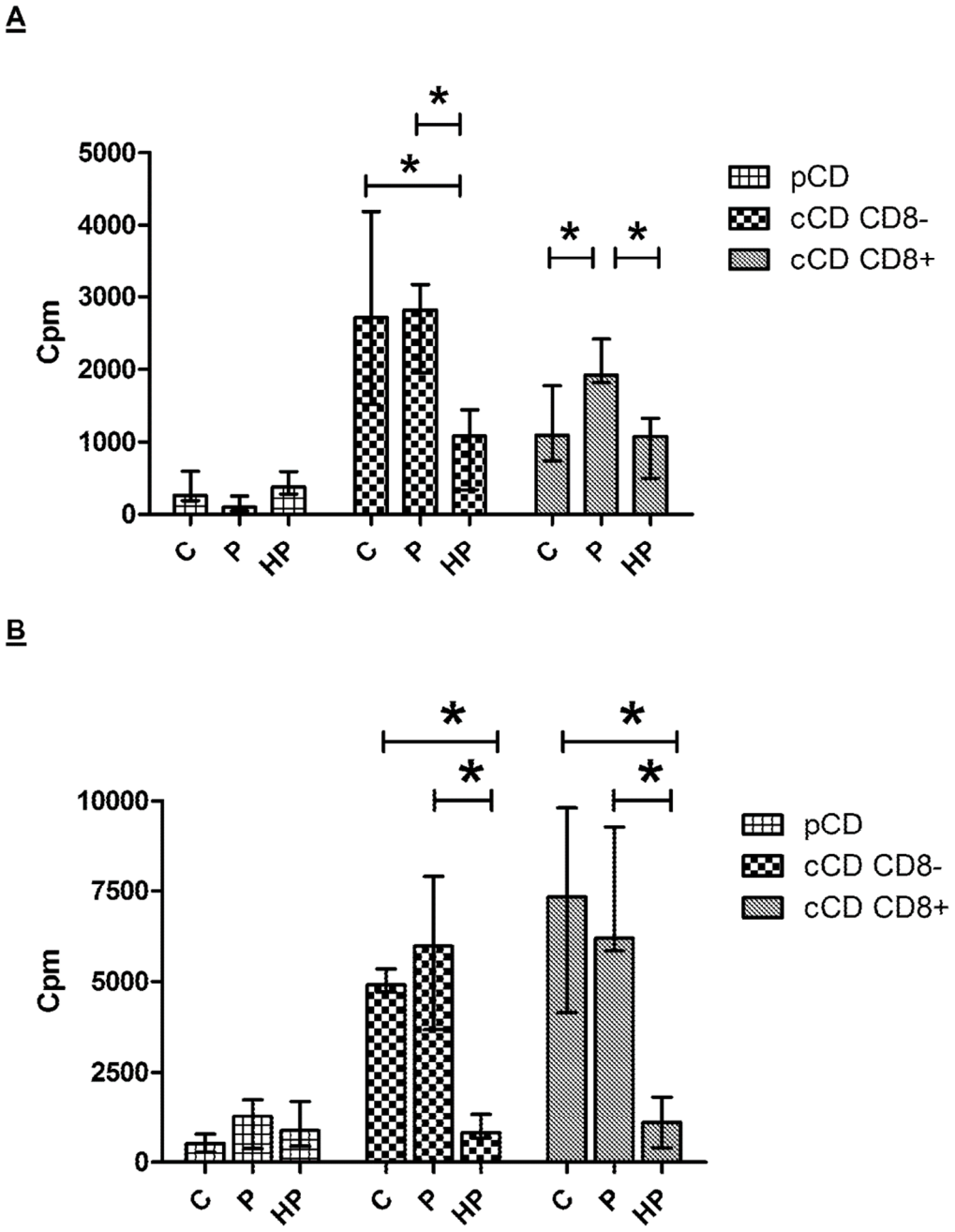

A
Cpm
5000
4000
3000
2000
1000
0
C
P
HP
pCD
cCD CD8-
cCD CD8+
B
Cpm
10000
7500
5000
2500
0
C
P
HP
pCD
cCD CD8-
cCD CD8+

Figura 11

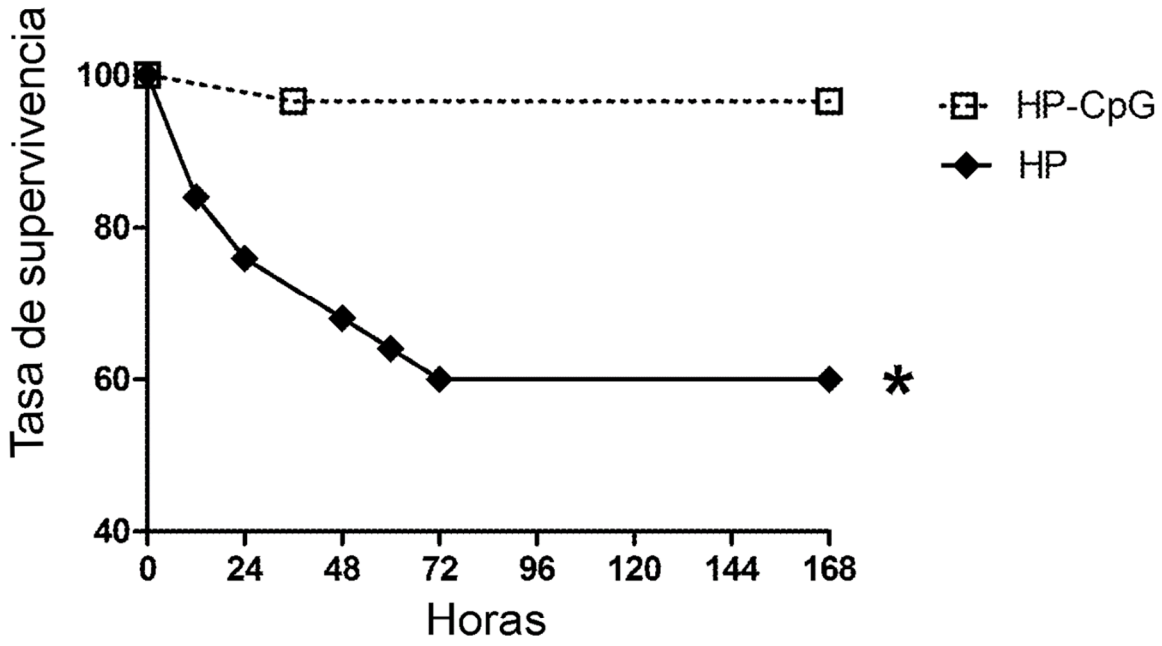

Tasa de supervivencia
100
80
60
40
0
24
48
72
96
120
144
168
Horas
HP-CpG
HP
*

Figura 12