

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 625**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2013 PCT/EP2013/068628**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037565**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2013 E 13759234 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2892920**

54 Título: **Péptidos inhibitorios derivados del receptor desencadenante expresado en células mieloides-1 (TREM-1) y del transcrito similar a TREM 1 (TLT-1) y sus usos**

30 Prioridad:

**07.09.2012 EP 12306079**

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

**03.12.2020**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75654 Paris Cedex 13, FR y  
UNIVERSITÉ DE LORRAINE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIBOT, SÉBASTIEN;  
BOUFENZER, AMIR;  
AIT-OUFELLA, HAFID y  
DERIVE, MARC**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 797 625 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

Péptidos inhibitorios derivados del receptor desencadenante expresado en células mieloides-1 (TREM-1) y del transcrito similar a TREM 1 (TLT-1) y sus usos

5

Campo de la invención

La invención se refiere a un péptido de menos de 50 aminoácidos que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 usado en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

10

Antecedentes de la invención

La enfermedad cardiovascular, el sello distintivo de muchas enfermedades, es un proceso líder de muerte en todo el mundo.

15

El infarto de miocardio o cerebral ejemplifica un síndrome clínico complejo que resulta de una isquemia de miocardio dañina y perjudicial, permanente o de transición. Esto generalmente es causado por la oclusión de la arteria coronaria / cerebral, lo que resulta en un desequilibrio entre el suministro y la demanda de oxígeno.

20

Los daños tisulares dependen de la duración de la isquemia. Para isquemia tan corta como 5 minutos, el tejido isquémico se recupera finalmente después de la reperfusión, sin síntomas de infarto o consecuencias letales. Sin embargo, la isquemia de duración significativa conduce a infarto y reacción inflamatoria. De hecho, el infarto se asocia con una reacción inflamatoria, que es un requisito previo para la cicatrización y la formación de cicatrices [Entman ML y otros, 1994 y Mehta JL y otros, 1999]. Esta respuesta se amplifica en términos de magnitud y duración cuando el tejido isquémico se reperfunde.

25

Esta respuesta es multifásica: la isquemia inicial induce necrosis, formación de especies de radicales libres de oxígeno, activación del complemento y una cascada de citocinas iniciada por la liberación de TNF-alfa. La fase de reperfusión del área de infracción está asociada con una reacción inflamatoria aumentada y acelerada responsable del reclutamiento de leucocitos en el sitio de la isquemia. Los leucocitos reclutados también participan en la liberación in situ y sistémica de mediadores inflamatorios, lo que conduce a un estado inflamatorio hiperactivado, responsable de las consecuencias fisiopatológicas del infarto.

30

Todos los mediadores inflamatorios tienen efectos controvertidos. De hecho, la fisiopatología del infarto se equilibra entre sus efectos beneficiosos y adversos. Por ejemplo, el TNF-alfa muestra efectos citoprotectores durante la isquemia miocárdica, así como también efectos nocivos [Harjot K Saini. y otros, 2005], en dependencia del tiempo, la duración y el nivel de su expresión y liberación. Esto puede explicar la complejidad de una terapia basada en el bloqueo de dichos mediadores inflamatorios.

35

40

La liberación de mediadores de la inflamación (citocinas, quimiocinas, ROS...) y el reclutamiento masivo de leucocitos juegan un papel importante durante todas las etapas de la cascada isquémica, desde los eventos dañinos tempranos provocados por la oclusión arterial hasta los procesos regenerativos tardíos subyacentes a la reparación del tejido postisquémico. Muchas estrategias terapéuticas dirigidas a esta respuesta inflamatoria no lograron demostrar ninguna eficacia. Ahora parece obvio que vale la pena tentar actuar sobre los lazos de amplificación en lugar de sobre el mediador inflamatorio inducido por isquemia individual.

45

La aterosclerosis da lugar a enfermedad cerebro-vascular y enfermedad de la arteria coronaria a través de una formación de lesión que progresa lentamente y un estrechamiento luminal de las arterias. Tras la rotura de la placa y la trombosis, estas formas más comunes de enfermedad cardiovascular se manifiestan como síndrome coronario agudo (SCA), infarto de miocardio o accidente cerebro-vascular. Los estudios en humanos y animales han establecido que la aterosclerosis es impulsada por un proceso inflamatorio crónico dentro de la pared arterial iniciado principalmente en respuesta a estructuras modificadas endógenamente, particularmente lipoproteínas oxidadas que estimulan respuestas inmunes innatas y adaptativas. La respuesta innata es instigada por la activación de las células vasculares y los monocitos/macrófagos, subsecuentemente se desarrolla una respuesta inmune adaptativa contra una serie de antígenos potenciales presentados a los linfocitos T efectores por las células presentadoras de antígeno [Ait-Oufella H y otros, 2011]. Los modelos de ratones genéticamente modificados nos enseñaron que los monocitos circulantes fueron reclutados en la pared vascular por las quimiocinas y luego se convirtieron en macrófagos y células espumosas cargadas de lípidos. Los macrófagos íntimos promueven el desarrollo de la placa a través de la liberación de citocinas, la amplificación de la inflamación y la desestabilización de la placa a través de la producción de proteasas y la acumulación de apoptosis [Libby P. 2002].

50

55

60

Los monocitos/macrófagos son estimulados por varios mediadores llamados PAMP (para patrones moleculares asociados a patógenos) que interactúan con los PRR (para receptores de reconocimiento de patógenos). Varios PRR están implicados en la fisiopatología de la aterosclerosis. Por ejemplo, los receptores tipo Toll se expresan en lesiones

65

ateroscleróticas humanas y animales. La inhibición de TLR reduce el desarrollo de aterosclerosis en ratones, lo que sugiere que atacar tales vías podría ser ateroprotectora [Bjorkbacka H y otros, 2004].

Recientemente, se ha descrito una nueva familia de receptores expresados en células mieloides: Receptores desencadenantes expresados en células mieloides (TREM). Entre esta familia, TREM-1 se expresa en monocitos/macrófagos y neutrófilos. La activación de TREM-1 conduce a la producción de citocinas y quimiocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1 y -3, MIP-1 $\alpha$ ...) junto con una rápida desgranulación de neutrófilos y explosión oxidativa [Radsak MP y otros, 2004 y Hara H, y otros, 2009].

La función TREM-1 es modular/amplificar en lugar de activar/iniciar la inflamación mediante la sinergia con los TLR para desencadenar una respuesta inmune exuberante. El papel fisiopatológico de TREM-1 se identificó en primer lugar durante las enfermedades infecciosas. De hecho, se ha demostrado que los polipéptidos que comprenden al menos 6 aminoácidos consecutivos de TREM-1 pueden tratar los síntomas de sepsis, shock séptico o afecciones similares a la sepsis [WO2006/056492]. También se sabe que TREM-1 desempeña un papel crucial durante la inflamación aséptica, tanto aguda (isquemia-reperusión mesentérica, choque hemorrágico, pancreatitis...) como crónica (enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades reumáticas...). Los hallazgos del laboratorio del inventor describieron que la administración de un péptido sintético de 17 aminoácidos que abarca la región complementaria del lazo 3 de TREM-1 a ratas sometidas a isquemia-reperusión intestinal previene en parte el colapso cardiovascular, la acidosis láctica y la respuesta inflamatoria sistémica y hepática asociada con isquemia-reperusión mesentérica [Gibot y otros. Crit Care Med. 2008].

TLT-1 (Transcrito similar a Trem 1) es un miembro de la familia TREM, pero se encuentra exclusivamente en megacariocitos y plaquetas. TLT-1 se identificó por primera vez para desempeñar un papel durante la agregación de plaquetas al unir fibrinógeno y estabilizar el agregado de plaquetas. Pero los nuevos hallazgos del laboratorio del inventor sobre TLT-1, TLT-1 soluble y polipéptidos derivados de sTLT-1 han demostrado que TLT-1 desempeña un papel durante la inflamación al inhibir específicamente TREM-1 [Derive M y otros, 2012, WO2010/124685].

Washington y otros describió que TLT-1 desempeña un papel protector durante la inflamación al facilitar la agregación plaquetaria en los sitios de lesión vascular (Washington y otros, J Clin Invest. 2009).

Dado que se sabe que la agregación plaquetaria se asocia con un peor resultado durante las enfermedades cardiovasculares (por ejemplo, infarto de miocardio y aterosclerosis), fue sorprendente encontrar que los péptidos derivados de TLT-1 tienen un efecto terapéutico sobre las enfermedades cardiovasculares.

Los inventores en la presente descripción describen que TREM-1 se expresa 1) por las células endoteliales de la aorta, la arteria mesentérica y las células microvasculares 2) por el tejido miocárdico y que su expresión está regulada por incremento en áreas infartadas después de la isquemia miocárdica (isquemia miocárdica permanente y transitoria isquemia miocárdica) 3) por los macrófagos reclutados en placas ateromatosas.

También muestran que tanto los péptidos derivados de TREM-1 como los derivados de TLT-1 pueden inhibir específicamente TREM-1 y disminuir la respuesta inflamatoria asociada a TREM-1 en el infarto de miocardio y la aterosclerosis.

Como resultado, la administración de estos péptidos durante la fase aguda de 2 modelos diferentes de isquemia miocárdica (isquemia permanente e isquemia transitoria) fue responsable de una modulación de la respuesta inflamatoria in situ y el consiguiente tráfico de leucocitos, lo que limitó la remodelación cardíaca posisquémica y las etapas posteriores de progresión de la enfermedad. De hecho, la función cardíaca mejoró dramáticamente 6 semanas después de la isquemia permanente, así como también el evento de isquemia transitoria (isquemia-reperusión). Esto se tradujo en ganancia de supervivencia.

Finalmente demuestran un papel de los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 en la reducción de la extensión de la formación de placa ateromatosa al inhibir específicamente TREM-1.

Por lo tanto, la invención se refiere a un péptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

## Resumen

Un objeto de la invención es un péptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular se selecciona de un infarto del miocardio o cerebral, infarto agudo de miocardio, enfermedad coronaria, síndrome coronario agudo, accidente cerebro-vascular, aneurisma, angina de pecho estable o de esfuerzo, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca hipertensiva, insuficiencia cardíaca (crónica y aguda), cor pulmonale, disritmias cardíacas, enfermedad cardíaca inflamatoria como endocarditis, miocarditis, enfermedad arterial periférica, disfunción miocárdica y vascular asociada a SIRS y aterosclerosis.

En una modalidad, dicho péptido comprende una secuencia de 6 aminoácidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.

En una modalidad, dicho péptido tiene una longitud de 6 a 20 aminoácidos.

En una modalidad, dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.

En una modalidad, dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4.

En una modalidad, la enfermedad cardiovascular es un infarto de miocardio.

En otra modalidad, la enfermedad cardiovascular es la aterosclerosis.

En una modalidad, dicho péptido debe inyectarse a un sujeto que lo necesite para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular se selecciona de un infarto de miocardio o cerebral, infarto de miocardio agudo, enfermedad coronaria, síndrome coronario agudo, accidente cerebro-vascular, aneurisma, angina de pecho estable o de esfuerzo, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca hipertensiva, insuficiencia cardíaca (crónica y aguda), cor pulmonale, arritmias cardíacas, enfermedad cardíaca inflamatoria como endocarditis, miocarditis, enfermedad arterial periférica, miocardio y vascular asociado a SIRS disfunción y aterosclerosis.

En una modalidad, dicho péptido se administrará en combinación con uno o más de otros compuestos contra enfermedades cardiovasculares.

En una modalidad, dicho péptido se administrará en combinación con uno o más de otros compuestos contra enfermedades cardiovasculares seleccionados de compuestos de estatina, enfoques anticoagulantes, compuestos anti-aldosterona, inhibidores de ECA y betabloqueantes.

Descripción detallada

### Definiciones

A lo largo de la especificación, se emplean varios términos y se definen en los siguientes párrafos.

Como se usa en la presente descripción, el término "TLT-1" para "transcrito similar a TREM 1" denota un miembro de la familia TREM. El trabajo inicial del grupo Mcvicar [Washington AV y otros, 2004] demostró que TLT-1 es abundante, específico para el linaje de plaquetas y megacariocitos, y está secuestrado en los gránulos de plaquetas  $\alpha$ . Tras la activación de plaquetas con trombina o LPS, TLT-1 se transloca a la superficie de las plaquetas. TLT-1 contiene un dominio extracelular de tipo Ig de conjunto v, una región transmembrana y una cola citoplasmática que comprende un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) y un dominio rico en poliprolina. A diferencia de otros miembros de la familia TREM, TLT-1 no se acopla a la cadena de activación de DAP 12, mientras que se ha demostrado que mejora la señalización de  $Ca^{++}$  en células de leucemia basofílica de rata (RBL), lo que sugiere que TLT-1 es un receptor coactivador. La secuencia de aminoácidos de TLT-1 se describe como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Como se usa en la presente descripción, el término "TREM-1" para "Receptor desencadenante expresado en células mieloides 1" denota una molécula de la superficie celular que se ha identificado tanto en neutrófilos polimorfonucleares humanos como murinos y monocitos maduros. Pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas y activa las vías de señalización aguas abajo con la ayuda de una proteína adaptadora llamada DAP12. La expresión de TREM-1 está regulada en gran medida por neutrófilos y monocitos en presencia de bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*, tanto en cultivo celular como en muestras de tejido de pacientes con infección. En contraste sorprendente, TREM-1 no está regulado en muestras de pacientes con enfermedades inflamatorias no infecciosas como psoriasis, colitis ulcerosa o vasculitis causadas por complejos inmunes. Además, cuando TREM-1 se une a su ligando, se observa un efecto sinérgico de LPS y una síntesis amplificada de las citocinas proinflamatorias como TNF-[alfa] junto con una inhibición de la producción de IL-10. La secuencia de aminoácidos de TREM-1 se describe como la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 se describen en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1.

Nombre del Péptido	Secuencia	SEQ ID
TLT1-LR17	LQEEDAGEYGC MVDGAR	SEQ ID NO: 3
TLT1-LR12	LQEEDAGEYGCM	SEQ ID NO: 4

5	TLT1-LR6-1	LQEEDA	SEQ ID NO: 5
	TLT1-LR6-2	EDAGEY	SEQ ID NO: 6
	TLT-1-LR6-3	GEYGCM	SEQ ID NO: 7
	TREM1-LP17	LQVEDSGLYQCVIYQPP	SEQ ID NO: 8
	TREM1-LP12	LQVEDSGLYQCV	SEQ ID NO: 9
10	TREM1-LP6-1	LQVEDS	SEQ ID NO: 10
	TREM1-LP6-2	EDSGLY	SEQ ID NO: 11
	TREM1-LP6-3	GLYQCV	SEQ ID NO: 12
15	secuencia aleatoria de LR12 de TLT-1	ELMEGGQECADY	SEQ ID NO: 13

Como se usa en la presente descripción, el término "variantes conservadoras de la función" denota péptidos derivados de un péptido de la invención en el que un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima se ha cambiado sin alteración en la conformación y función general del péptido, incluyendo, pero no limitado a, reemplazo de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrofóbico, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína, de modo que el por ciento de similitud de secuencia de proteínas o aminoácidos entre dos proteínas cualquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % según lo determinado de acuerdo con un método de alineación tal como el Método del clúster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de la función" también incluye un péptido que tiene al menos 20 % de identidad de aminoácidos según lo determinado por algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente 40 % con mayor preferencia 60 %, preferentemente al menos 75 %, con la máxima preferencia al menos 85 %, y aún con mayor preferencia al menos 90 %, y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína nativa u original con la que se compara.

Como se usa en la presente descripción, el término "derivado" se refiere a una variación de un péptido de la invención o de una variante conservadora de la función del mismo que se modifica de cualquier otra manera, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al péptido, mediante la adición de un compuesto químico en cualquiera de los aminoácidos de la secuencia, para modificar *in vitro* o *en vivo* conformación, actividad, especificidad, eficacia o estabilidad del péptido.

Como se usa en la presente descripción, los términos "tratar" o "tratamiento" denotan revertir, aliviar, inhibir el progreso o prevenir el trastorno o afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

De acuerdo con la invención los términos "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a composiciones y entidades moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administran a un mamífero, especialmente un humano, de manera adecuada. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga líquida, semisólida o sólida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

De acuerdo con la invención, el término "paciente" o "individuo" a tratar está destinado a un mamífero humano o no humano (como un roedor (ratón, rata), un felino, un canino o un primate) afectado o Es probable que se vea afectado por trastornos inflamatorios. Preferentemente, el sujeto es un humano.

## 50 Péptidos

Un aspecto de la invención se refiere a un péptido que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos seleccionados de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular se selecciona de un infarto del miocardio o cerebral, infarto agudo de miocardio, enfermedad coronaria, síndrome coronario agudo, accidente cerebro-vascular, aneurisma, angina de pecho estable o de esfuerzo, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca hipertensiva, insuficiencia cardíaca (crónica y aguda), cor pulmonale, disritmias cardíacas, enfermedad cardíaca inflamatoria como endocarditis, miocarditis, enfermedad arterial periférica, disfunción miocárdica y vascular asociada a SIRS y aterosclerosis.

60 En una modalidad, dicho péptido no es la SEQ ID NO: 1.

En una modalidad, dicho péptido no es la SEQ ID NO: 2.

65 En una modalidad, el péptido tiene una longitud de menos de 50 aminoácidos, menos de 40, 35, 30, 25, 20 aminoácidos.

- En una modalidad preferida, el péptido de acuerdo con la invención tiene una longitud de 6 a 20 aminoácidos, o de 10 a 20 aminoácidos, o de 12 a 18 aminoácidos o de 14 a 16 aminoácidos.
- 5 En una modalidad preferida, el péptido de acuerdo con la invención tiene una longitud de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.
- En otra modalidad, el péptido de acuerdo con la invención comprende una secuencia de 6 consecutivos aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7.
- 10 En otra modalidad preferida, el péptido de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 3.
- En otra modalidad preferida, el péptido de acuerdo con la invención comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 4.
- 15 En otra modalidad preferida, el péptido de acuerdo con la invención consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7.
- 20 En otra modalidad, el péptido de acuerdo con la invención puede tener configuración D o L.
- En otra modalidad, el aminoácido del extremo amino del péptido de acuerdo con la invención tiene un grupo amino terminal acetilado, y el aminoácido del extremo carboxilo tiene un grupo carboxilo terminal amidado. Por lo tanto, la invención también incluye derivados del péptido de la invención en el que el extremo amino terminal está acetilado o en el que el extremo carboxilo terminal está amidado.
- 25 Además, los péptidos de acuerdo con la invención pueden sufrir modificaciones químicas reversibles para aumentar su biodisponibilidad (incluida la estabilidad y la solubilidad en grasas) y su capacidad para pasar la barrera hematoencefálica y el tejido epitelial. Los ejemplos de tales modificaciones químicas reversibles incluyen la esterificación de los grupos carboxilo de aminoácidos glutámicos y aspárticos con un alcohol, de esta manera retirando la carga negativa del aminoácido y aumentando su hidrofobicidad. Esta esterificación es reversible, ya que el enlace de éster formado es reconocido por las esterasas intracelulares que lo hidrolizan, restaurando la carga a los residuos aspártico y glutámico. El efecto neto es una acumulación de péptido intracelular, ya que el péptido desesterificado internalizado no puede atravesar la membrana celular.
- 30 Otro ejemplo de tales modificaciones químicas reversibles incluye la adición de una secuencia peptídica adicional, que permite el aumento de la permeabilidad de la membrana, como un péptido TAT o un péptido Penetratin (ver - Charge-Dependent Translocation of the Trojan. A Molecular View on the Interaction of the Trojan Peptide Penetratin with the 15 Polar Interface of Lipid Bilayers. Biophysical Journal, Volume 87, Issue 1, 1 July 2004, Pages 332-343).
- 35 Los péptidos de acuerdo con la invención pueden obtenerse a través de métodos convencionales de síntesis química de péptidos en fase sólida, siguiendo la metodología basada en Fmoc y/o Boc 20 (véase Pennington, M.W. and Dunn, B.N. (1994). Peptide synthesis protocols. Humana Press, Totowa.).
- 40 Alternativamente, los péptidos de acuerdo con la invención pueden obtenerse a través de métodos convencionales basados en tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, a través de un método que, en resumen, incluye insertar la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención en un plásmido o vector apropiado, transformando células competentes para dicho plásmido o vector, y cultivar dichas células en condiciones que permitan la expresión del péptido de la invención y, si se desea, aislar y (opcionalmente) purificar el péptido de la invención a través de medios convencionales conocidos por expertos en estos asuntos. La secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención puede deducirse fácilmente de la correspondencia que existe entre los aminoácidos y los codones de nucleótidos que codifican dichos aminoácidos. En este caso, un objeto adicional de la invención es una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica el péptido de la invención. En una modalidad particular, dicho ácido nucleico se selecciona de ADN monocatenario, ADN bicatenario y ARN. Otros objetos adicionales de esta invención son los plásmidos y los vectores de expresión que contienen dicha secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención, así como también las células procariontas o eucariotas que expresan el péptido de la invención. Se puede encontrar una revisión de los principios de la tecnología del ADN recombinante, por ejemplo, en el libro de texto titulado "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering," R.W. Old & S.B. Primrose, published by Blackwell Scientific Publications, 4ta Edición (1989).
- 45 Como se describió, la invención también incluye péptidos que son funcionalmente equivalentes a los péptidos de la invención o "variante conservadora de funciones". En el sentido usado en esta descripción, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que el péptido en cuestión tiene al menos una de las actividades biológicas del péptido de la invención, como, por ejemplo, la capacidad de disminuir la inflamación.
- 50 El efecto de los péptidos de la invención se hará evidente para la persona experta mediante la implementación de una prueba simple para evaluar la disminución de la inflamación en las enfermedades cardiovasculares debido a los
- 55
- 60
- 65

péptidos. Por ejemplo,  $5 \times 10^5$  neutrófilos humanos aislados o macrófagos o células endoteliales se incuban en presencia de 100 ng/ml de LPS y/o 10  $\mu\text{g/ml}$  de AcM anti-TREM-1 con o sin 20  $\mu\text{g/ml}$  de polipéptido durante 24 horas a 37 °C / 5 %  $\text{CO}_2$ . Luego se recoge el sobrenadante y se miden las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-6 y GM-CSF mediante ELISA. Si el péptido estudiado inhibe TREM-1, las concentraciones de citocinas deben disminuir hasta en un 30 % o más en comparación con las condiciones sin péptido.

Ácidos nucleicos, vectores y células huésped recombinantes de la invención.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos de acuerdo con la invención.

En una modalidad preferida, la molécula de ácido nucleico que codifica un péptido que tiene una secuencia SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7.

Una "secuencia codificante" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, como un ARN, péptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, péptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese péptido, proteína o enzima. Una secuencia codificante para una proteína puede incluir un codón de inicio (generalmente ATG) y un codón de parada.

Estas moléculas de ácido nucleico pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica, en particular por mutagénesis de sitio dirigido del gen que codifica la proteína nativa. Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en un vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o vector viral.

Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención se refiere a un vector y un casete de expresión en el que una molécula de ácido nucleico de la invención está asociada con elementos adecuados para controlar la transcripción (en particular, promotor, potenciador y, opcionalmente, terminador) y, opcionalmente, traducción, y también los vectores recombinantes en los que se inserta una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Estos vectores recombinantes pueden ser, por ejemplo, vectores de clonación o vectores de expresión.

Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo por el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula huésped, para transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que se pueda insertar y expresar un gen que codifique un péptido o derivado químico de la invención. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1 beta d2-4 y similares.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares.

Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores adenovirales, retrovirales, virus del herpes y AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante transfección transitoria con plásmidos auxiliares o 30 virus. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5,882,877, US 6.013.516, US 4,861,719, US 5,278,056 y WO 94/19478.

Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y potenciador de SV40 (Mizukami T. y otros 1987), promotor LTR y potenciador del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana Y y otros, 1987), promotor (Mason JO y otros, 1985) y potenciador (Gillies SD y otros, 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

La invención también incluye sistemas de administración de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención, que puede usarse en terapia génica *en vivo* o *ex vivo*. Esto incluye, por ejemplo, vectores de transferencia viral tales como los derivados de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus, que se usan convencionalmente en terapia génica. Esto también incluye sistemas de administración de genes que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención y un vehículo de administración de genes no virales. Los ejemplos de vehículos de administración de genes no virales incluyen liposomas y polímeros tales como polietileniminas, ciclodextrinas, polímeros de histidina/lisina (HK), etc.

Otro objeto de la invención es también una célula huésped procarionta o eucariota transformada genéticamente con al menos una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

El término "transformación" significa la introducción de un gen "extraño" (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN a una célula huésped, de modo que la célula huésped expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente un proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducido. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido ha sido "transformada".

5 Preferentemente, para expresar y producir los péptidos, y en particular el péptido de acuerdo con la invención, se elegirán células eucariotas, en particular células de mamífero, y más particularmente células humanas.

10 Típicamente, podrían usarse líneas celulares tales como CHO, BHK-21, COS-7, C127, PER.C6 o HEK293 25, por su capacidad para procesar las modificaciones postraduccionales correctas de los derivados.

15 La construcción de vectores de expresión de acuerdo con la invención, la transformación de las células huésped se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas convencionales de biología molecular. Los derivados de la subunidad c de la V-ATPasa de la invención pueden obtenerse, por ejemplo, cultivando células genéticamente transformadas de acuerdo con la invención y recuperando el derivado expresado por dicha célula del cultivo. Luego, si es necesario, pueden purificarse mediante procedimientos convencionales, conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante precipitación fraccionada, en particular precipitación con sulfato de amonio, electroforesis, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.

20 En particular, los métodos convencionales para preparar y purificar proteínas recombinantes pueden usarse para producir las proteínas de acuerdo con la invención.

Métodos terapéuticos, usos y composiciones farmacéuticas.

25 Un tercer objeto de la presente invención se refiere a un péptido de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

30 Un objeto de la invención es un método para tratar una enfermedad cardiovascular en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido como se describe aquí anteriormente. En una modalidad, dicho método comprende administrar un péptido como se describe aquí anteriormente, en donde dicho péptido inhibe TREM-1.

35 Enfermedad cardiovascular de acuerdo con la invención que incluye pero no se limita a infarto de miocardio y cerebro, infarto agudo de miocardio, isquemia, enfermedad coronaria, síndrome coronario agudo, accidente cerebro-vascular, aneurisma, angina de pecho estable o de esfuerzo, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca hipertensiva, insuficiencia cardíaca (crónica y aguda), cor pulmonale, disritmias cardíacas, enfermedades cardíacas inflamatorias como endocarditis, miocarditis, enfermedad arterial periférica, disfunción vascular y miocárdica asociada a SIRS, aterosclerosis.

40 En una modalidad, la condición de enfermedad cardiovascular es infarto de miocardio.

En otra modalidad, la condición de enfermedad cardiovascular es la arteriosclerosis.

45 En otra modalidad, la condición de enfermedad cardiovascular es la disfunción vascular y miocárdica asociada a SIRS.

En una modalidad, la enfermedad cardiovascular no es la isquemia reperfusión mesentérica.

50 En otra modalidad, la enfermedad cardiovascular no comprende protección cardiovascular durante la sepsis polimicrobiana.

En una modalidad, los péptidos de la invención no se usan para tratar la sepsis.

En una modalidad, los péptidos de la invención no se usan para tratar isquemia y síndromes de reperfusión.

55 En una modalidad, los péptidos de la invención no se usan para tratar pacientes con afecciones hipercoaguladoras.

En una modalidad, los péptidos de la invención no se usan para tratar la hemorragia asociada a la inflamación.

60 En una modalidad, los péptidos de la invención no se usan para tratar la miocarditis viral aguda.

65 En una modalidad de la invención, los péptidos de la invención se usan para tratar una enfermedad cardiovascular seleccionada en el grupo que consiste en infarto de miocardio y cerebro, isquemia miocárdica, enfermedad coronaria, accidente cerebro-vascular, aneurisma, angina de pecho estable o de esfuerzo, cardiomiopatía, hipertensiva enfermedad cardíaca, insuficiencia cardíaca (crónica y aguda), cor pulmonale, arritmias cardíacas, enfermedad cardíaca inflamatoria como endocarditis, miocarditis, enfermedad arterial periférica, disfunción miocárdica y vascular asociada a SIRS y aterosclerosis.

En una modalidad particular, la invención se refiere a un péptido de una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

5 En una modalidad, la invención también se refiere a un ácido nucleico aislado de acuerdo con la invención o a un plásmido de acuerdo con la invención o a un vector de expresión de acuerdo con la invención o a una célula huésped de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.

10 Los péptidos de acuerdo con la invención pueden tratar afecciones inflamatorias a través de sus propiedades de receptor señuelo.

Por "receptor señuelo" se entiende que los polipéptidos de acuerdo con la invención (péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1) atrapan el ligando TREM-1 y evitan sus efectos fisiológicos sobre TREM-1.

15 Por lo tanto, los péptidos de acuerdo con la invención podrían formar parte de una terapia combinada (dirigida a varios objetivos terapéuticos) con el objetivo de detener más eficazmente la enfermedad cardiovascular.

20 Un objeto adicional de esta invención es una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido de acuerdo con la invención, junto con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una modalidad particular, dicha composición farmacéutica también contiene uno o más péptidos (COOH). Alternativamente, la composición farmacéutica de la invención puede contener una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector que contiene al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de la invención, junto con al menos un adyuvante y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho vector puede usarse en terapia génica.

25 Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad suficiente del derivado quimérico de la invención para tratar la enfermedad cardiovascular con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

30 Se debe entender que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención serán decididos por el médico que lo atiende dentro del alcance del criterio médico. El nivel de dosis específica terapéuticamente efectiva para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidencia con el polipéptido específico empleado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es correcto para los expertos en la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores que aquellos requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1000 mg por dulto por día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Un medicamento típicamente contiene de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferentemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz de un fármaco se administra comúnmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

50 Los productos activos de la invención (péptidos, ácido nucleico, plásmido, vector de expresión o célula huésped) pueden administrarse para su uso en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

55 La cantidad terapéuticamente efectiva del producto activo de la invención [péptidos o vectores (construcciones)] que debe administrarse, así como también la dosis para el tratamiento de una afección patológica con los péptidos y/o composiciones farmacéuticas de la invención, dependerán en numerosos factores, que incluyen la edad y el estado del paciente, la gravedad del trastorno o trastorno, el método y la frecuencia de administración y el péptido particular que se utilizará.

60 La presentación de las composiciones farmacéuticas que contienen los péptidos o vectores (construcciones) de la invención puede ser de cualquier forma que sea adecuada para la administración, por ejemplo, sólida, líquida o semisólida, como cremas, pomadas, geles o soluciones, y estas composiciones pueden administrarse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía oral, parenteral, inhalación o tópica, por lo que incluirán los excipientes farmacéuticamente aceptables necesarios para fabricar la forma de administración deseada. Puede encontrar una revisión de las diferentes formas farmacéuticas para administrar medicamentos y de los excipientes necesarios para obtenerlos, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Gal nica "(Tratado de Farmacia Galénica), C. Faul i Trillo, 1993, Luz n 5, SA Ediciones, Madrid.

65

- En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la administración por vía oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local, pulmonar o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de la vía oral tales como tabletas, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, formas de administración en aerosoles, implantes, subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.
- Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que se puede inyectar. Estos pueden estar en soluciones salinas estériles, isotónicas particulares (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de estas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas las que, tras la adición, en dependencia del caso, de agua o solución salina fisiológica esterilizada, permite la constitución de soluciones inyectables.
- Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto de que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.
- Las soluciones que comprenden los compuestos de la invención como una base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezcladas con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse además en glicerina, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.
- Los péptidos de acuerdo con la invención pueden formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácidas (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico oxálico, mandélico, y similares. Las sales con los grupos carboxilo libres pueden derivarse, además, de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.
- El portador puede ser además un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, con el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y con el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse por el uso en las composiciones de agentes absorción retardada, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los péptidos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución de este, anteriormente esterilizada por filtración.
- Después de la formulación, las soluciones serán administradas de forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse las cápsulas de liberación del fármaco y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, si es necesario, la solución debe regularse adecuadamente con tampón y primero, el diluyente líquido se torna isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, a la luz de la presente descripción los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o se inyecta en el sitio propuesto de infusión. Algunas variaciones en la dosificación ocurrirán necesariamente en dependencia de la afección del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará en cualquier caso la dosis adecuada para el sujeto individual.

El péptido de la invención puede formularse dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. Además, pueden administrarse múltiples dosis.

5 Además de los compuestos de la invención formulados para la administración parenteral, tal como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, tabletas u otros sólidos para la administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma usada actualmente.

10 Como se mencionó anteriormente, los péptidos de acuerdo con la invención podrían formar parte de una terapia combinada con el fin de detener más eficazmente la enfermedad cardiovascular. En este caso, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye al menos un péptido de la invención; junto con otro u otros compuestos para enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, compuestos de estatinas, enfoques anticoagulantes, compuestos antialdosterona, inhibidores de ECA (inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) y betabloqueadores.

15 Además, la invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular en mamíferos que consiste en administrar a dicho mamífero que padece dicha enfermedad cardiovascular una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un péptido de la invención, o de un vector que contiene al menos una Secuencia de ADN que codifica un péptido de la invención, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica que lo contiene. En una modalidad particular de esta invención, dicha composición farmacéutica contiene, además del péptido o péptidos de la invención, uno o más péptidos (COOH).

20 En una modalidad, la enfermedad cardiovascular de acuerdo con la invención incluye, pero no se limita a infarto de miocardio y cerebral, infarto agudo de miocardio, isquemia, enfermedad coronaria, síndrome coronario agudo, accidente cerebro-vascular, aneurisma, angina de pecho estable o de esfuerzo, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca hipertensiva, insuficiencia cardíaca (crónica y aguda), cor pulmonale, disritmias cardíacas, cardiopatía inflamatoria como endocarditis, miocarditis, enfermedad arterial periférica, disfunción vascular y miocárdica asociada a SIRS, aterosclerosis.

25 La invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

#### Breve descripción de los dibujos

35 Figura 1: La modulación de TREM-1 por péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 es beneficiosa contra la disfunción vascular inducida in vitro por  $\alpha$ TREM-1 y LPS. Curvas de concentración-respuesta a fenilefrina (A y B) y acetilcolina (C) en anillos aórticos. Las aortas se cosecharon de ratas sanas y se estimularon in vitro con  $\alpha$ TREM-1 (5  $\mu$ g/ml) y LPS (10  $\mu$ g/ml) con o sin péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 o péptido de secuencia aleatoria de LR12. B: algunas aortas fueron desendotelizadas (-E). Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes, valores p: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, ns: no significativo.

40 Figura 2: TREM-1 se expresa en células endoteliales de arterias conductoras y resistivas. La aorta de ratón (una arteria conductora) (A) y la arteria mesentérica de rata (una arteria resistiva) (B) se estimularon con o sin LPS como se indica. La expresión de Trem-1 se determinó por qRT-PCR. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes, valores p: \*\*\* valor de p < 0,001. ns (no significativo).

45 Figura 3: TREM-1 se expresa constitutivamente e inducible en células endoteliales microvasculares. Las células CD146+/VEGFR2+ aisladas de pulmón e hígado de ratón (LuMEC y LiMEC) se analizaron por citometría de flujo para la expresión de TREM-1. TREM-1 se expresa constitutivamente en Li/LuMEC (A). La expresión de TREM-1 es inducible in vivo durante la sepsis experimental (A) o in vitro tras 1 hora de estimulación con LPS (B). La cinética de las expresiones TREM-1 y VEGFR2 también fueron analizadas por FACS (C). El LPS indujo una regulación al alza dependiente del tiempo de las expresiones TREM-1 y VEGFR2, que fueron prevenidas por los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1. Los datos son representativos de al menos 10 experimentos diferentes, valores p: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

50 Figura 4: Cinética de la expresión de TREM-1 tras la estimulación con LPS. (A) LuMEC in vitro (CD146+, VEGFR2+) se estimularon con LPS durante 4h y 12h y se analizaron mediante qRT-PCR para las expresiones (A) Trem-1, Tnf- $\alpha$  (B) e Il-6 (C). Los datos son representativos de al menos 10 experimentos diferentes.

55 Figura 5: Los efectos de los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 sobre la producción de citocinas por LuMEC estimularon 24h con LPS. (A) las concentraciones de proteínas en los sobrenadantes de LuMEC estimulados 24 h con LPS se analizaron mediante ELISA \*, p < 0,05; \*\*, P < 0,01. \*\*\*, P < 0,001.

(B) Medición de citocinas/quimiocinas en LuMEC estimulada durante 24h con LPS. Los datos se expresan como una relación entre los controles y las células tratadas con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (una relación > 1 indica una mayor concentración en los controles que en las células tratadas).

Los datos son representativos de al menos 10 experimentos diferentes.

5  
 Figura 6: las vías de señalización intracelular vascular in vivo deterioradas durante la sepsis se restauran con la modulación TREM-1 por TREM-1 y péptidos derivados de TLT-1. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 pueden restaurar un deterioro de la vía de Akt y la expresión de Cox-1, así como también restaurar una regulación positiva de la vía inducible ejemplificada por Cox-2 e iNOS. Este efecto se midió en aortas (A) y arterias mesentéricas (B).

Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes, valores p: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Figura 7: La modulación de TREM-1 por TREM-1 y péptidos derivados de TLT-1 es beneficiosa contra la disfunción cardíaca inducida por sepsis.

15 La administración de péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 durante el modelo de rata de disfunción cardíaca inducida por sepsis se asocia con un aumento de la función cardíaca intrínseca medida por catéter Millar (FEVG, ESPVR, dpdmax/Ved, PRSW).

Los datos son representativos de al menos 10 experimentos diferentes.

20 Figura 8: La modulación de TREM-1 por TREM-1 y péptidos derivados de TLT-1 es beneficiosa contra la hipotensión inducida por sepsis y la disfunción cardíaca.

(A) La administración de péptidos derivados de TLT-1 y TREM-1 durante el modelo mini-cerdo de disfunción cardíaca inducida por sepsis se asocia con una disminución en la infusión de noradrenalina necesaria para mantener una presión arterial media estable (85 mmHg). De hecho, MAP fue constantemente más alto y la dosis de noradrenalina más baja en los animales tratados con péptidos derivados de TLT-1 y TREM-1 que los controles.

(B) Evolución del índice cardíaco, índice de potencia cardíaca, SvO2 y suministro de oxígeno. Todos estos parámetros fueron mayores en los animales tratados con péptidos derivados de TLT-1 y TREM-1 que en los controles.

(C) El desarrollo de acidosis e hiperlactatemia fueron atenuados por LR12. Grupo LR12, n=6 // Grupo de secuencia aleatoria de LR12 n=5.

Figura 9: La modulación de TREM-1 por TREM-1 y péptidos derivados de TLT-1 es beneficiosa contra la alteración inducida por sepsis en la presión arterial diastólica, sistólica y media.

35 La administración de péptidos derivados de TLT-1 y TREM-1 durante el modelo de mono de disfunción cardíaca inducida por sepsis (endotoxemia) previene por completo la caída transitoria inducida por endotoxina en la presión arterial (media (A), sistólica (B) y diastólica (C) ) (p <0,001 péptido de control frente a LR12). Media (± DE). n=6/grupo.

Figura 10: TREM-1 se expresa en el tejido miocárdico y está regulado durante la isquemia.

(A) Cuantificación de ARNm de q-PCR de TREM-1 en el miocardio al inicio y en las áreas infartadas 6, 12 y 24 horas después del infarto de miocardio.

(B) Cuantificación de la proteína TREM-1 24 horas después del infarto de miocardio.

Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes. Los resultados son la media ± DE. Los valores de p son \* p <0,001 [áreas sanas versus áreas infractadas].

Figura 11: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, al modular TREM-1, controlan el reclutamiento de leucocitos en el miocardio infartado, así como también la movilización de leucocitos desde compartimientos remotos.

50 (A) Cuantificación de citometría de flujo de infiltración de leucocitos en miocardio infartado en diferentes puntos de tiempo en ratones tratados con péptidos derivados de TLT-1 y TREM-1 o el péptido de control (LR12-scr); n=5 ratones por grupo y por punto de tiempo; \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001 versus LR12-scr, #p <0,05, ##p <0,01 versus Sham.

(B) Cuantificación por citometría de flujo de los subtipos de leucocitos en la médula ósea, la sangre y el bazo en diferentes momentos después del infarto de miocardio; n=6-7 en cada punto de tiempo; \*\*\* p <0,001, \*\* p <0,01, \* p <0,05 versus ratones tratados con LR12-scr; # p <0,01, # p <0,05 versus ratones operados por Sham.

(C) Concentraciones plasmáticas de MCP-1 y MCP-3 después del IM; n=5 ratones; \*\*\* p <0,001 versus animales tratados con LR12-scr.

Figura 12: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, al inhibir TREM-1, modulan la reacción inflamatoria miocárdica durante la isquemia en ratones.

Para estos experimentos, se obtuvo lisado de miocardio 24 horas después de la inducción de infarto de miocardio de ratones tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 o péptido de secuencia aleatoria de LR12 de control ('controles'). Se estudiaron dos áreas: un área sana cosechada distalmente de la zona infartada en un

animal control y un área infartada. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes. Los resultados son la media  $\pm$  DE. Los valores de p son \* p <0,001 [LR12 versus controles].

Transferencia Western de lisados de tejido miocárdico analizados con anticuerpos contra fosfo (p)-p38, (p)-ERK1/2, iNOS, Cox2, (p)-Akt, (p)-GSK3 $\beta$ , Socs3.

5  
Figura 13: Efectos de los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 sobre la producción de citocinas por el tejido miocárdico durante la isquemia en ratones.

Para estos experimentos, se obtuvo lisado de miocardio 6, 24 y/o 96 horas después de la inducción de infarto de miocardio de ratones tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 o péptido de secuencia aleatoria de LR12 de control ('controles'). Las áreas infartadas se analizaron para la producción de citoquinas/quimiocinas. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes. Los valores de p son \*p<0,001 [LR12 versus controles].

15 (A) Medición de citocinas/quimiocinas en tejido de miocardio infartado 24 horas después del infarto de miocardio. Los datos se expresan como una relación entre los controles y los animales tratados con TREM-1 y péptidos derivados de TLT-1 (una relación > 1 indica una concentración más alta en los controles que en los ratones tratados).

(B) Expresión de citocinas: Niveles de ARNm de Tnf- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 en tejido de miocardio con infracción 6, 24 y 96 horas después del infarto de miocardio.

20  
Figura 14: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, al inhibir TREM-1, disminuyen la actividad de la proteasa en las áreas infartadas de miocardio.

Para estos experimentos, se obtuvo lisado de miocardio 6, 24 y 96 horas después de la inducción de infarto de miocardio de ratones tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 o péptido de secuencia aleatoria de LR12 de control ('controles'). Se analizaron las áreas infartadas. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes.

25 (A) cuantificación de ARNm de Q-PCR de Mmp9;

(B) Timp-1 y;

(C) Zimografía representativa en gel que refleja la actividad de gelatinasa Mmp-9 al inicio del estudio, 12, 24 y 96 horas después del infarto de miocardio. Arriba: animales tratados con péptido de control; abajo: Animales tratados con LR12.

Figura 15: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, al inhibir TREM-1, mejoran la supervivencia después del infarto de miocardio en ratones.

35 Se sometieron ratones Balb/c machos adultos (20-23 g) a isquemia miocárdica y se agruparon aleatoriamente (n=10-15 por grupo) para recibir péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 repetidos (100  $\mu$ g en 0,2 mL de NaCl 0,9 % una vez al día durante 5 días), LR12 de secuencia aleatoria (100  $\mu$ g en 0,2 mL de NaCl 0,9 % una vez al día durante 5 días), o 10  $\mu$ g de AcM anti-TREM-1 en inyecciones de 0,2 mL de NaCl 0,9 % i.p. La supervivencia se controló durante 1 semana y se analizó mediante la prueba Log Rank. (No hubo muertes después del 5to día). Los datos son representativos de al menos 15 experimentos diferentes.

40  
Figura 16: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, al inhibir TREM-1, mejoran la función cardíaca después de la isquemia-reperusión miocárdica en ratas.

45 Las ratas Wistar machos adultas se sometieron a isquemia-reperusión miocárdica y se agruparon al azar (n=10) para recibir péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 repetidos (3 mg/kg en 0,2 mL de NaCl 0,9 % una vez al día durante 5 días) o LR12 de secuencia aleatoria (3 mg/kg en 0,2 mL de NaCl 0,9 % una vez al día durante 5 días). Seis semanas después de la lesión miocárdica, se investigó la función cardíaca bajo anestesia mediante el uso de un catéter de conductancia. Emáx, ESPVR y PRSW fueron mayores en animales tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 que en ratas control. Todos p <0,02 [controles versus LR12]).

50  
Figura 17: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, al inhibir TREM-1, mejoran las funciones sistólicas y diastólicas después del infarto de miocardio en ratas.

55 Las ratas Wistar machos adultas fueron sometidas a isquemia miocárdica y se agruparon al azar (n=20) para recibir péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 repetidos (3 mg/kg en 0,2 mL de NaCl 0,9 % una vez al día durante 5 días) o LR12 de secuencia aleatoria (3 mg/kg en 0,2 mL de NaCl 0,9 % una vez al día durante 5 días). Seis semanas después de la lesión miocárdica, se investigó la función cardíaca bajo anestesia mediante el uso de un catéter de conductancia. Todos los parámetros estudiados fueron mejores en animales tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 que en ratas control (todos p <0,01 [controles versus LR12]).

60  
Figura 18: Las placas ateroscleróticas en el seno aórtico forman ratones apoE-/- tratados mediante inyección intraperitoneal diaria de PBS (izquierda) o LR12 (derecha) durante 4 semanas.

El tratamiento con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 reduce el desarrollo de aterosclerosis en el seno aórtico evaluado mediante el uso de tinción con aceite rojo: 103318  $\mu$ m<sup>2</sup> con tratamiento LR12 *versus* 146736  $\mu$ m<sup>2</sup> con administración del vehículo, p=0,02. Los datos son representativos de al menos 15 experimentos diferentes.

65  
Figura 19: Tinción de macrófagos (anti-MOMA2, rojo) en placa aterosclerótica. El tratamiento con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 en ratones apoE-/- reduce la infiltración de macrófagos en placas ateroscleróticas

( $p=0,004$ ) en un 27 % *versus* control de animales, tal como se cuantifica por tinción inmunofluorescente e inmunohistoquímica (anti-MOMA2).

5 Figura 20: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, al inhibir TREM-1, inducen una reducción de la población de monocitos circulantes no clásicos en el día 7.

Los monocitos circulantes CD115<sup>+</sup>Gr1<sup>bajo</sup> y CD115<sup>+</sup>Gr1<sup>alto</sup> se contaron después de la tinción mediante citometría de flujo a los 7 días en un modelo de ratones ateroscleróticos. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes. ( $p<0,05$ ).

10 Figura 21: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, al inhibir TREM-1, reducen la leucocitosis en el día 28.

Los monocitos circulantes CD115<sup>+</sup>Gr1<sup>bajo</sup> y CD115<sup>+</sup>Gr1<sup>alto</sup> se contaron después de la tinción mediante citometría de flujo a los 28 días en un modelo de ratones ateroscleróticos. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,001$ .

15 Figura 22: El tratamiento con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 reduce la infiltración de monocitos dentro de las lesiones.

Los monocitos se marcaron in vivo mediante inyección retro-orbital IV de 1  $\mu\text{m}$  de microesferas fluorescentes verdes fluorescentes Fluoresbrite diluidas 1:4 en PBS estéril. El recuento de cuentas fluorescentes en la lesión refleja el reclutamiento de monocitos. Los datos son representativos de al menos 5 experimentos diferentes. \* $p<0,05$ .

## EJEMPLOS

### Materiales y Métodos

#### 25 Péptidos

Basado en las secuencias TLT-1 y TREM-1 en GenBank | EMBL | DDBJ (números de acceso AY078502, AF534822, AF241219 y AF287008), los péptidos TREM-1 y TLT-1 fueron diseñados imitando diferentes partes de sus dominios extracelulares (TREM1-LP17, TREM1-LP12, TREM1-LP6-1, TREM1-LP6-2, TREM1-LP6-3, TLT1-LR17, TLT1-LR12, TLT1-LR6-1, TLT1-LR6-2 y TLT1-LR6-3). Se sintetizaron químicamente (Pepscan Presto BV, Lelystad, Holanda) como péptidos amidados por Cter para ensayos in vivo. Los péptidos correctos se obtuvieron con >99 % de rendimiento y fueron homogéneos después de la purificación preparativa, según lo confirmado por espectrometría de masas y cromatografía líquida analítica de alto rendimiento en fase inversa. Estos péptidos estaban libres de endotoxina. Los péptidos de secuencia aleatoria correspondientes se sintetizaron de manera similar y sirvieron como péptidos de control.

#### Animales

40 Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité local para el cuidado y uso de animales de laboratorio y se realizaron de acuerdo con las directrices internacionales sobre experimentación con animales. Se obtuvieron ratones y ratas del Charles River (Estrasburgo, Francia).

#### 45 Aislamiento de aorta torácica de ratón y arteria mesentérica de rata

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico. Se realizó una incisión abdominal en la línea media y se abrió el tórax para exponer la aorta torácica (ratones) o la arteria mesentérica (ratas).

50 Los vasos se vaciaron de sangre y se incubaron durante 20 horas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10 % y antibióticos. Se aplicaron diferentes condiciones al azar: 1) vasos de control 2) vasos incubado ex vivo con LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 3) LPS y tratamiento peptídico 4)  $\alpha$ TREM-1 agonista (5  $\mu\text{g/ml}$ ) 5) vasos desendoteliales incubados con LPS y tratamiento.

55 En algunos experimentos, se extrajeron ARN y proteínas totales de los vasos después de la estimulación.

#### Reactividad vascular

60 La reactividad vascular de la aorta se estudió en una miografía de alambre (EMKA Technologies, Francia). Los experimentos se realizaron a 37 °C en una solución salina fisiológica (PSS) con la siguiente composición: 119 mmol/L NaCl, 4,7 mmol/L KCl, 14,9 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1,18 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y 5,5 mmol/L glucosa, burbujeando continuamente con 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>). Después de un período de equilibrio (al menos 20 minutos) bajo la tensión pasiva óptima, se produjeron dos contracciones sucesivas en respuesta a la combinación de despolarización de KCl (100 mM) y fenilefrina (Phe) 10  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Falavier, Francia) se utiliza para probar la capacidad contráctil máxima de los vasos. Después de un período de lavado de 20 minutos, se obtuvieron curvas de concentración-respuesta a PE mediante la administración acumulativa de este agonista vasoconstrictor (InM a 100  $\mu\text{M}$ ). Después de un nuevo período de lavado, se evaluó la relajación dependiente del

endotelio probando el efecto relajante de la acetilcolina (ACh) (1 nM a 100  $\mu$ M; Sigma, St Louis, MO, EE. UU.) Después de una precontracción por 1  $\mu$ M de fenilefrina (Phe). La presencia de endotelio funcional se confirmó con acetilcolina (1  $\mu$ M), lo que provocó una relajación superior al 50 %.

##### 5 Aislamiento de células endoteliales microvasculares de pulmón e hígado (LuMEC y LiMEC)

Los ratones fueron sacrificados bajo anestesia profunda (pentobarbital) para recolectar pulmones e hígados. El aislamiento de células endoteliales microvasculares de pulmón e hígado de ratón se realizó de acuerdo con un protocolo descrito previamente [Daqing y otros, 1998] con algunas modificaciones. Brevemente, los órganos se lavaron en FBS-DMEM al 10 %, se picaron en cuadrados de 1-2 mm y se digirieron con colagenasa Tipo I (2 mg/ml, Gibco) a 37 °C durante 1 h con agitación ocasional. La digestión celular se filtró a través de un filtro de células de 70  $\mu$ m, se centrifugó a 1,500 rpm y las células se colocaron en placas recubiertas con gelatina que contiene medio DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 20 % de FBS, 100  $\mu$ g/ml de ECGS (BD Biosciences) y antibióticos. El día 1, las células flotantes se eliminaron y se lavaron con PBS y se añadió medio de cultivo fresco. Después de 5 días, se realizó la primera purificación de estas células usando el kit CD146 MicroBead. Después de la tripsinización, las células se resuspendieron en medio de crecimiento y luego se sembraron en placas recubiertas con gelatina fresca. Después de 15 días, las células se sometieron a una segunda purificación de acuerdo con el mismo procedimiento. Se verificó la pureza (>85 %) y la viabilidad de las células endoteliales. Además, con el análisis FACS, el fenotipo celular se evaluó mediante la determinación de la expresión de VEGFR2 y CD146 por citometría de flujo.

##### 20 Preparación de mini-cerdo y monitoreo de hipotensión inducida por sepsis y disfunción cardíaca inducida por sepsis

Se adquirieron mini cerdos macho adultos (*Sus scrofa* doméstica, mini cerdos vietnamitas barrigones, 30-40 kg) en Elevage Ferry (Vosges, Francia). Antes de la cirugía, los animales estaban en ayunas durante la noche con libre acceso al agua. La preanestesia se realizó mediante administración intramuscular de ketamina (10 mg/kg) y midazolam (0,1 mg/kg). La anestesia fue inducida y mantenida con pentobarbital intravenoso (bolo inicial: 10 mg/kg, y administración continua 6-8 mg/kg/h), sufentanilo intermitente (10  $\mu$ g) y pancuronio (4 mg) si es necesario. Los animales fueron ventilados mecánicamente (volumen corriente 8 ml/kg, PEEP 5 cm H<sub>2</sub>O, FiO<sub>2</sub> 0,21, frecuencia respiratoria 14-16 respiraciones/min ajustadas para mantener la normocapnia). Se expuso la vena yugular izquierda y se insertó una línea de triple luz. La vena yugular derecha también se cateterizó y se colocó un catéter Swan-Ganz que permite el registro continuo del gasto cardíaco, SvO<sub>2</sub> y la aurícula derecha y la presión arterial pulmonar. Se insertó un catéter de arteria carótida derecha para la medición continua de la presión arterial. Un catéter en la vejiga permitió la recolección de orina.

35 Después de la instrumentación, se realizó una laparotomía en la línea media para recolectar heces fecales del colon izquierdo: Se suspendieron 1,5 g/kg en 200 mL de NaCl al 0,9 % y se incubaron a 38 °C durante 2 horas. Después de la cirugía, se dejó un tubo para la inducción de peritonitis y el drenaje de ascitis.

40 Después de la cirugía, se permitió que los animales se recuperaran durante 2 horas antes de las mediciones iniciales (definidas como 'H0'). La solución salina normal se administró continuamente (10 ml/kg/h) durante todo el estudio. La temperatura corporal se mantuvo constante ( $\pm$  1 °C) usando almohadillas térmicas o enfriamiento.

45 Después de la recogida de datos basales (H0), se indujo peritonitis mediante la administración de heces fecales autólogas a través del tubo abdominal que subsecuentemente se mantuvo sujeto. Después de 2 horas (H2), los animales fueron aleatorizados para recibir LR12 (grupo LR12, n=6) o el vehículo (solución salina normal) solo (grupo control, n=5). Se administró un bolo de 5 mg/kg (en 60 ml) por vía intravenosa durante 30 minutos, luego se inició una infusión de 1 mg/kg/h (15 ml/h) y se prolongó durante todo el período de estudio.

50 El cuidado de los animales fue proporcionado por un médico experimentado en cuidados intensivos con estricta adhesión a las siguientes pautas durante todo el período de estudio:

- i) Objetivos hemodinámicos: el objetivo principal era mantener la presión arterial media (MAP) por encima de 85 mmHg. Para lograr este objetivo y además de la administración de NaCl al 0,9 % de mantenimiento (7 ml/kg/h), se utilizó hidroxietilalmidón (hasta 20 ml/kg durante todo el período de estudio) (HES 130/0,4, Voluven®, Fresenius) permitido siempre y cuando la presión venosa central (PVC) y la presión de oclusión de la arteria pulmonar (POAP) fuera < 18 mmHg. Cuando se alcanzó el volumen máximo de hidroxietilalmidón, se inició una infusión continua de noradrenalina hasta 10  $\mu$ g/kg/min.
- 55 ii) Objetivos respiratorios: el objetivo principal era mantener una relación PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> > 300 y una PaCO<sub>2</sub> arterial a 35-45 mmHg. La configuración del ventilador podría modificarse aumentando la relación inspiratoria/espironaria cerca de 1:1, PEEP hasta 15 cm H<sub>2</sub>O y frecuencia respiratoria hasta 30 respiraciones/min.
- 60 iii) La temperatura corporal debe mantenerse constante ( $\pm$  1 °C) utilizando almohadillas térmicas o enfriamiento.
- iv) La infusión intravenosa de glucosa se debe administrar cuando sea necesario para mantener la glucemia a 5-7 mmol/L.

65 Los parámetros hemodinámicos fueron monitoreados continuamente, incluyendo MAP, presión arterial pulmonar media (MPAP), presión auricular derecha (RAP), gasto cardíaco (CO), índice cardíaco (IC) y SvO<sub>2</sub>. El suministro de

oxígeno sistémico (DO<sub>2</sub>) y el consumo de oxígeno sistémico (VO<sub>2</sub>) se calcularon mediante el monitor Swan-Ganz. Índice de potencia cardíaca (W/m<sup>2</sup>) se calculó como MAP x CI / 451 (24).

Preparación de monos y monitoreo de hipotensión inducida por sepsis y disfunción cardíaca inducida por sepsis

Se utilizaron monos cynomolgus machos (*Macaca fascicularis*) (2,8 a 3,5 kg, 24 meses de edad, Le Tamarinier, La Route Royale, Tamarin, Mauricio). Los animales estaban en ayuna el día anterior al reto de LPS, pero con pleno acceso al agua. El Comité Ético de CIToxLAB Francia (CEC) revisó y aprobó todos los planes de estudio (Nr CEC: 02221).

Administración de fármacos y reto in vivo con LPS.

Se registraron signos vitales y peso el día anterior al reto con LPS. A la mañana siguiente, se recogieron muestras de laboratorio clínico de referencia y se registró un conjunto de signos vitales de referencia. El fármaco se administró en la vena cefálica o safena a través de un catéter de teflón. La vena contralateral se usó para la administración de LPS.

Los monos fueron asignados al azar para recibir LR12 o placebo (n=6 por grupo). Se constituyó un grupo adicional de 4 para recibir solo infusión de vehículo (NaCl 0,9 %) y sirvió como grupo de control.

En tiempo 0, se inició una infusión intravenosa de 15 minutos de LR12 o solución de placebo, a una velocidad de 12 ml/h (5 mg/kg, 10 minutos, 2 ml), administrada por una bomba de jeringa calibrada (Aparato Harvard). Luego se administró una infusión continua durante 8 horas más a una velocidad de 2 ml/h (1 mg/kg/h, 8 horas, 16 ml). Justo antes de la infusión del tratamiento, se administró un bolo intravenoso de LPS (10 µg/kg) en el transcurso de un período de 10 minutos en el catéter contralateral. Los animales permanecieron despiertos en una posición vertical en una silla de sujeción y continuaron ayunando de la comida durante todo el estudio.

La frecuencia del pulso y la presión arterial se controlaron cada 15 minutos durante 1 hora, luego cada 30 minutos durante 7 horas.

Modelo de ratón de infarto de miocardio

Todos los procedimientos se realizaron en ratones C57BL/6 machos con edades comprendidas de 6-8 semanas. Los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de xilazina (60 mg/kg) y se fijaron en posición supina. La tráquea se intubó y se ventiló (el volumen corriente fue de 200 µl/25 g y la frecuencia respiratoria fue de 120 respiraciones/min). Después de una toracotomía izquierda, se identificó la arteria coronaria izquierda y se ligó con una sutura quirúrgica de prolene 8-0 a 1,0 mm distal de la punta de la aurícula izquierda. La oclusión de LAD se confirmó por un cambio en el color del miocardio de rojo a blanco en el área de isquemia (ventrículo izquierdo). Se cerró la cavidad torácica y se suturó la piel con seda 6-0. Los animales regresaron a su jaula donde son supervisados hasta su completa recuperación.

Los ratones fueron monitoreados después de la cirugía por mortalidad. Los ratones se aleatorizaron para recibir o no péptidos (inyección i.p. diaria durante 5 días, 5 mg/kg) y se monitorizó su supervivencia. Alternativamente, los ratones se sacrificaron después de 6h, 24h, 96h (n=6 por grupo) mediante anestesia seguida de sobredosis de pentobarbital sódico. Se realizó una esternotomía media seguida de escisión del corazón y disección de áreas isquémicas y no isquémicas. La extracción de ARN y la extracción de proteínas se realizaron para RT-PCR, WB, inmunohistología y análisis ELISA.

Citometría de flujo

Las células endoteliales microvasculares (MEC) de ratones sanos C57BL/6 y sépticos (CLP) se aislaron como se describe y se incubaron con VEGFR2 anti-ratón y anti-TREM-1 conjugado con FITC y PE durante 20 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron en formaldehído al 0,1 % y luego se analizaron en un citómetro de flujo. Como control, se usó el isotipo IgG2a de ratón a la misma concentración.

En otros experimentos, los MEC se estimularon o no con LPS (0,1 µg/ml) durante 2 y 6h antes del análisis por FACS.

Para preparar suspensiones de células individuales a partir de tejido de infarto, se recolectaron corazones; picada con finas tijeras; colocado en un cóctel de colagenasa I, colagenasa XI, DNasa I e hialuronidasa (Sigma-Aldrich); y se agitó a 37 °C durante 1h. Las células se trituraron a continuación y se centrifugaron (15 min, 500 g, 4 °C).

Se retiraron los bazo, se trituraron en HBSS a 4 °C con el extremo de una jeringa de 3 ml y se filtraron a través de filtros de nylon (BD) de 70 µm. La suspensión celular se centrifugó a 300 g durante 10 minutos a 4 °C. Los glóbulos rojos se lisaron (solución de lisis de glóbulos rojos, Miltenyi), y los esplenocitos se lavaron con HBSS y se resuspendieron en HBSS suplementado con BSA al 0,2 % (p/vol). Se extrajo sangre periférica mediante punción cardíaca con solución de citrato como anticoagulante, y se lisaron los glóbulos rojos. Finalmente, se obtuvieron suspensiones de células individuales de médula ósea de fémures después de lavarlas con 1 ml de HBSS, filtrar a

través de filtros de nylon de 70 µm y centrifugar a 300 g durante 10 minutos a 4 °C. Los números de células viables totales se determinaron a partir de alícuotas mediante el uso de un hemocitómetro con azul Trypan (BioRad).

Las suspensiones celulares se incubaron en un cóctel de AcM contra células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> (CD4- o CD8-APC, CD3ε-PE, CD45-FITC), células B (CD19-PE, CD45-FITC), granulocitos (CD45-FITC, Ly-6G-APC), subconjuntos de monocitos (CD115-PE, Ly-6C-APC, CD45-FITC), todos los anticuerpos de Miltenyi Biotech. Los números de células informados se calcularon como el producto del total de células vivas (leucocitos viables totales por ml) y el porcentaje de células dentro de la puerta seleccionada, y se informaron por mg de tejido (corazón), por órgano (fémur y bazo), o por ml (sangre). Los datos fueron adquiridos en un citómetro FC500 (Beckman Coulter).

Extracción de ARN y análisis de reacción en cadena de la polimerasa

Los ARN totales se extrajeron de las células o áreas isquémicas y no isquémicas usando el Mini Kit RNeasy Plus (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) y se cuantificaron con NanoDrop (ThermoScientific) antes de volver a transcribirse con el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad) y cuantificarse mediante PCR cuantitativa usando sondas Qiagen disponibles (Quantitect Primers) para mTREM-1, mTNF-α, mL-6, mMMP-9, mTIMP-1 y mActB. Alternativamente, los ARN totales se retrotranscribieron con RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, Francia) para matrices de PCR (células inmunitarias/endoteliales innatas de ratón RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays, SABiosciences). Todas las PCR se realizaron en un termociclador MyiQ y se cuantificaron mediante el software IQ5 (Qiagen). La expresión génica se normalizó con ActB.

Análisis de fosforilación de proteínas.

Los tejidos de áreas isquémicas y no isquémicas o MEC se lisaron con reactivo de extracción PhosphoSafe (Novagen) y se centrifugaron durante 5 minutos a 16 000 g 4 °C para recoger el sobrenadante. La concentración de proteína se determinó de acuerdo con el método de Bradford (Pierce). Luego se analizaron los lisados mediante transferencia Western (Criterion XT Bis-Tris Gel, 4-12 %, BioRad y membrana PVDF, Millipore), revelados con anti-fosfo-p38, -pERK1/2, -pAKT, -pGSK3β, -iNOS, -COX2, -SOCS3, -TREM-1 y el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano picante (Señalización celular) y Sustrato SuperSignal West Femto (Pierce). Anti-p38, -ERK1/2, -AKT, -GSK3β, o - Tubulin se utilizaron para la normalización. También se estudió un panel de múltiples proteínas fosforiladas mediante inmunotransferencia (Phospho-Kinase Array; R&D Systems). La adquisición y los análisis cuantitativos de la densidad de las señales se realizaron con el generador de imágenes LAS-4000 y el software Multi-Gauge (Fujifilm).

Medición de concentración de citoquinas

Las citoquinas en los lisados de miocardio (áreas isquémicas y no isquémicas) y los sobrenadantes de MEC se midieron mediante ELISA (kits Mouse Quantikine ELISA, R&Dsystems) y ensayos de panel de citoquinas (Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, Panel A, R&Dsystems) de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes.

Zimografía

La actividad enzimática de MMP-9 en extractos de tejido se determinó mediante zimografía de gelatina SDS-PAGE. El MMP-9 presente en los extractos de tejido degrada la matriz de gelatina, dejando una banda transparente después de teñir el gel para la proteína. Brevemente, las muestras de tejido homogeneizadas y normalizadas se desnaturalizaron sin agente reductor y se separaron por electroforesis en gel de SDS-PAGE al 7,5 % que contiene gelatina. Luego, los geles se incubaron en presencia de Triton X-100 (para renaturalizar la proteína) a temperatura ambiente durante 2 horas y subsecuentemente a 37 °C durante la noche en un tampón que contiene 10mM CaCl<sub>2</sub>, 0,15M NaCl y 50mM Tris (pH 7,5). Posteriormente, los geles se tiñeron con 0,25 % de azul de coomassie. El análisis y la cuantificación de las bandas se realizaron por densitometría.

Modelo de rata de isquemia permanente miocárdica

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas (360-380 g). Todas las ratas fueron anestesiadas con ketamina (100 mg/kg, por vía intramuscular) y ventiladas mecánicamente. Después de una toracotomía izquierda, se identificó la arteria coronaria izquierda y se ligó con una sutura quirúrgica de prolene 6-0. La oclusión de LAD se confirmó por un cambio en el color del miocardio de rojo a blanco en el área de isquemia (ventrículo izquierdo). Se cerró la cavidad torácica y se suturó la piel con seda 6-0. Los animales regresaron a su jaula donde fueron supervisados hasta su completa recuperación. La tasa de mortalidad postoperatoria de todas las ratas fue del 20 %.

Después de la oclusión quirúrgica de LAD, se evaluó la importancia del área isquémica mediante imágenes de micro-TEP. Los animales fueron aleatorizados para recibir péptido (5 mg/kg) cada 24 h durante 5 días o placebo (vehículo).

Se realizó una evaluación adicional a las 6 semanas por medio de imágenes de micro-TEP y catéter de conductancia (Millar) para estudiar el efecto del tratamiento sobre la remodelación miocárdica y la función miocárdica.

Modelo de rata de reperfusión de isquemia miocárdica

Los animales recibieron la misma cirugía que en la isquemia permanente, pero con reperfusión del área isquémica mediante la liberación de la ligadura LAD después de 60 minutos de isquemia. Luego se aplicó el mismo protocolo como se describió anteriormente.

Imagen MicroPET

En todos los animales, aproximadamente 70 MBq de <sup>18</sup>F se inyectó F-FDG (en un volumen de 0,3-0,5 ml) por vía intravenosa y bajo anestesia corta (1,5-2,5 % de inhalación de isoflurano) 60 min antes de iniciar el registro PET. La grabación se adquirió en modo de lista bajo anestesia continua con isoflurano, mediante el uso de un sistema PET dedicado para animales pequeños (Inveon, Siemens, Knoxville, TN, EE. UU.). Los animales se colocaron en posición prono y se colocaron sobre una almohadilla térmica para mantener una temperatura corporal dentro del rango normal. Los animales se conectaron a un monitor de ECG estándar mediante tres electrodos colocados en las superficies internas de las extremidades de las extremidades. Los tiempos de grabación fueron de 20 minutos para la emisión de <sup>18</sup>F y 6 minutos para la transmisión de <sup>57</sup>Co. La ventana de tiempo de coincidencia se estableció en 3,4 ns y la ventana de energía entre 350 y 650 keV. Las imágenes se reconstruyeron en 16 intervalos cardíacos, proporcionando una resolución temporal de 11-15 ms para valores de frecuencia cardíaca comunes. En estas condiciones, la resolución espacial axial era inferior a 1,5 mm. Además, en los fantasmas de rata de LV obtenidos mediante un proceso de estereolitografía, las imágenes de PET con FDG proporcionaron una determinación precisa de los volúmenes de cavidad reales por encima del nivel de 100 µl correspondiente al límite inferior para el volumen endistólico del LV en adultos.

Estudios de catéter de conductancia

Las ratas se anestesiaron con isoflurano y se insertó un catéter de micro manómetro de alta fidelidad 2 F (SPR-407, Millar Institute, Houston, TX, EE. UU.) En el LV a través de la arteria carótida derecha. El catéter Millar se conectó a un sistema de adquisición de datos de Harvard conectado a una PC con el software AcqKnowledge III (ACQ 3.2).

Aterosclerosis en ratón

Los ratones ApoE<sup>-/-</sup> machos de 12 semanas de edad se sometieron a una dieta rica en grasas (lípidos 15 %, colesterol 1,25 %, sin colato) y se trataron mediante inyección intraperitoneal diaria de péptidos (100 µg/día) o PBS. Después de 4 semanas de dieta rica en grasas, los ratones fueron sacrificados para su análisis.

Las placas ateroscleróticas se tiñeron con aceite rojo y se cuantificaron en el seno aórtico. Mediante el uso de tinción inmunofluorescente e inmunohistoquímica, analizamos la composición de la placa. Finalmente, exploramos los efectos del tratamiento de péptidos en el reclutamiento de monocitos en las placas ateroscleróticas mediante el uso de la técnica de tinción de pulso desarrollada por Potteaux y otros. Brevemente, los monocitos se marcaron in vivo por inyección retro-orbital i.v. de 1 µm de microesferas fluorescentes verdes fluorescentes Fluoresbrite diluidas 1:4 en PBS estéril [Potteaux y otros, 2011]. El conteo de cuentas fluorescentes en las lesiones refleja el reclutamiento de monocitos.

Resultados

1. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 mejoran la disfunción contráctil y endotelial inducida por LPS en la aorta:

Para investigar si la modulación TREM-1 podría afectar directamente la vasomotricidad endotelial, ex vivo vasos estimulados o vasos desendoteliales disecados de ratas normales, con LPS, αTREM-1 (un agonista de TREM-1), péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 y el péptido de control se secuencian aleatoriamente de LR12. Primero, tanto el LPS, así como también la αTREM-1 indujeron el deterioro de la vasomotricidad (Figura 1A y C). Luego, los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 restauraron el deterioro de vasomotricidad asociado a LPS (Figura 1B y C). Finalmente, todos los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 pierden sus efectos beneficiosos cuando se elimina el endotelio (Figura 1B).

2. TREM-1 se expresa en células endoteliales de aorta y arteria mesentérica:

Para determinar si TREM-1 se expresa en células endoteliales de aorta de ratón y arteria mesentérica de rata, estimulamos los vasos (con o sin endotelio) con LPS durante 6h (100 ng/ml). La expresión de TREM-1 estaba regulada por estimulación con LPS, solo cuando el endotelio estaba presente, tanto en la aorta de ratón (Figura 2A) como en la arteria mesentérica de rata (Figura 2B).

Por lo tanto, mostramos por primera vez que TREM-1 se expresa en células endoteliales de aorta de ratón y arteria mesentérica de rata.

3. TREM-1 se expresa en células endoteliales microvasculares de pulmón e hígado (LuMEC y LiMEC):

TREM-1 se expresa constitutivamente en células endoteliales microvasculares de pulmón e hígado; su expresión está regulada durante la sepsis y por estimulación con LPS (Figura 3). Estos resultados fueron confirmados por RT-PCR en tiempo real (Figura 3C).

La expresión de TREM-1 aumentó fuertemente después de 4 h de estimulación con LPS y luego disminuyó posteriormente. De manera similar, TNF- $\alpha$  e IL-6 mostraron la misma cinética (Figura 4).

Como se esperaba, la estimulación de las células con LPS durante 24h condujo a una producción robusta de varias citocinas cuyas concentraciones fueron reducidas por los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (Figura 5).

Por lo tanto, el tratamiento con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 fue capaz de atenuar la producción de citocinas proinflamatorias por las células endoteliales.

4. La modulación TREM-1 mejora la disfunción cardiovascular inducida por sepsis:

Modelo de ratones: Observamos que la administración de péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 conservaba la presión arterial media y amortiguaba la acidosis láctica durante el shock séptico en ratones. La exploración de la señalización vascular mostró que la vía de Akt se ve afectada durante la sepsis, así como también la expresión de Cox-1 en paralelo a una regulación por aumento de Cox-2 e iNOS. Estos elementos, que atestiguan la disfunción vascular, se restauran mediante la modulación TREM-1 (Figura 6).

Modelo de rata: También nos centramos en la función cardíaca intrínseca (Figura 7; Tabla 2) y demostramos que la modulación TREM-1 por péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 se asocia con una mejora de varios parámetros cardíacos: ESPVR (relación presión sistólica-volumen final), PRSW (trabajo de accidente cerebro-vascular reclutable de precarga), (dP/dt) max/Ved (marcador de presión ventricular izquierda) y LVEF (fracción de eyección ventricular izquierda).

Tabla 2: La modulación TREM-1 es beneficiosa contra la disfunción cardíaca inducida por sepsis.

	FEVG	ESPVR	dpdtmax/Ved	PRSW
Vehículo	42,1 $\pm$ 7,2	1,5 $\pm$ 0,2	55 $\pm$ 20	79 $\pm$ 11
TLT1-LR17	75,6 $\pm$ 7,2	2,5 $\pm$ 0,3	150 $\pm$ 12	145 $\pm$ 6
TLT1-LR12	77,2 $\pm$ 9,2	2,7 $\pm$ 0,1	158 $\pm$ 18	143 $\pm$ 7
TLT1-LR6-1	79,6 $\pm$ 7,4	2,9 $\pm$ 0,3	160 $\pm$ 15	142 $\pm$ 8
TLT1-LR6-2	75 $\pm$ 5,9	2,3 $\pm$ 0,2	155 $\pm$ 12	139 $\pm$ 10
TLT-1LR6-3	78 $\pm$ 8,7	2,2 $\pm$ 0,2	157 $\pm$ 10	149 $\pm$ 6
TREM1-LP17	75,9 $\pm$ 8,9	2,7 $\pm$ 0,3	156 $\pm$ 11	150 $\pm$ 8
TREM1-LP12	72 $\pm$ 9,4	2,8 $\pm$ 0,2	158 $\pm$ 18	139 $\pm$ 6
TREM1-LP6-1	76 $\pm$ 5,9	2,5 $\pm$ 0,3	150 $\pm$ 20	145 $\pm$ 6
TREM1-LP6-2	79,4 $\pm$ 9,9	2,7 $\pm$ 0,1	155 $\pm$ 15	144 $\pm$ 6
TREM1-LP6-3	78,6 $\pm$ 7,4	2,9 $\pm$ 0,4	163 $\pm$ 10	139 $\pm$ 8
TLT-1-LR12scr	39,9 $\pm$ 4,9	1,6 $\pm$ 0,3	61 $\pm$ 12	88 $\pm$ 8

Modelo de mini-cerdo: En un modelo de sepsis con mini cerdo, observamos que la administración de péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 atenúa la insuficiencia cardiovascular. La peritonitis indujo una disminución rápida de MAP (Figura 8A) a pesar de la resucitación de volumen (7750  $\pm$  540 ml para los controles frente a 6500  $\pm$  800 ml para el grupo LR12, p=0,137). Por lo tanto, para mantener la MAP > 85 mmHg, H12 inició norepinefrina en animales de control 4/5 y 1/6 y tratados con LR12 respectivamente. La velocidad de infusión de noradrenalina necesaria para mantener la presión arterial fue significativamente menor en los animales tratados con LR12 que en los controles (Figura 8A).

Asociado a la hipotensión, los índices de potencia cardíaca y cardíaca (que se cree que describen mejor el rendimiento cardíaco) se deprimieron en el grupo de control. Esto se tradujo en una disminución progresiva de SvO<sub>2</sub> y DO<sub>2</sub> (Figura 8B). Nuevamente, LR12 mostró efectos beneficiosos significativos en la atenuación de la insuficiencia cardíaca. Ambos grupos desarrollaron una acidosis láctica progresiva (Figura 8C), aunque en gran medida atenuada por LR12 (p = 0,0005).

Modelo de mono: En un modelo de infusión de endotoxinas en monos, observamos que la administración de péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 atenúa la insuficiencia cardiovascular. La frecuencia cardíaca aumentó transitoriamente después de la inyección de LPS sin efectos de la infusión de LR12 (no se muestra). El reto con LPS indujo un ligero aumento de la temperatura corporal, especialmente entre H1 y H2, pero la diferencia entre el placebo (LR12scr) y los animales tratados con LR12 no fue significativa (no se muestra).

Incluso si las dosis de LPS utilizadas fueron pequeñas, se desarrolló hipotensión transitoria en el grupo tratado con placebo: la presión arterial sistólica disminuyó hasta un 25 % a 180 minutos y la presión arterial diastólica hasta un 40 % ( $p < 0,001$  frente a LR12 o grupos de control). Por contraste, los monos tratados con LR12 nunca se volvieron hipotensos y su presión arterial no difería de los animales de control (Figura 9).

5. TREM-1 se expresa en el tejido miocárdico y está regulado durante la isquemia:

Para determinar si TREM-1 se expresa en el tejido cardíaco, se extrajo miocardio de ratones antes de la ligadura coronaria y luego a las 6, 24 y 96 horas después del infarto de miocardio (IM) tanto en áreas sanas como infartadas. La expresión basal de TREM-1 fue muy baja, mientras que la isquemia indujo una regulación progresiva de la expresión con un nivel más alto alcanzado 24 horas después del IM (Figura 10A). La misma cinética se observó a nivel de proteína por Transferencia Western (Figura 10B). Por el contrario, la expresión de TREM-1 permaneció baja en áreas no infartadas ('sanas') en todo momento (datos no mostrados).

6. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 modulan el reclutamiento de leucocitos durante el IM en ratones y regulan la movilización de leucocitos desde compartimientos remotos:

En el ratón, y probablemente también en los humanos, existen 2 subtipos de monocitos diferentes: Los monocitos Ly-6C<sup>alto</sup> son mediadores inflamatorios potentes, mientras que los monocitos Ly-6C<sup>bajo</sup> poseen efectos opuestos [NAHRENDORF y otros, 2007]. La modulación de TREM-1 por péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 anuló completamente la infiltración de miocardio infartado por monocitos Ly-6C<sup>alto</sup>, mientras que aumenta temporalmente el reclutamiento de monocitos Ly-6C<sup>bajo</sup>. La infiltración de PMN también fue bloqueada por el tratamiento con LR12 (Figura 11A). Aunque TREM-1 no se expresa por los linfocitos, la modulación TREM-1 influyó en la movilización de las células B y T: La infiltración de linfocitos B- y CD8<sup>+</sup> se redujo, mientras que el reclutamiento de células CD4<sup>+</sup> se incrementó en ratones tratados con LR12.

Como TREM-1 parece importante para regular el reclutamiento de leucocitos al miocardio infartado, investigamos su efecto sobre la movilización celular desde compartimientos remotos. Después del infarto de miocardio, los monocitos salen del bazo en 24 horas para infiltrarse en el corazón (SWIRSKI, y otros). Este fenómeno se observó aquí con una disminución rápida del contenido de monocitos del bazo que dura hasta 1 semana después del infarto de miocardio. Concomitantemente, una elevación pronunciada del número de monocitos circulantes estuvo presente a las 72 horas, mientras que se produjo una acumulación progresiva en la médula ósea (BM) (Figura 11B). La eliminación o modulación de TREM-1 derogó casi por completo el agotamiento de monocitos esplénicos, así como también la monocitosis sanguínea.

El recuento de neutrófilos en sangre periférica se incrementó a las 72 horas y volvió a la línea de base a los 7 días. Esta neutrofilia no se observó en ratones con *Trem-1* suprimido o en ratones tratados con LR12. El bazo no parecía ser un gran contribuyente para la producción/liberación de neutrófilos ya que su contenido esplénico apenas cambió. También se observó una acumulación progresiva y modesta en BM, sin diferencias entre los grupos (Figura 11B).

Los números de linfocitos B-, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> se redujeron drásticamente en el bazo 24 horas después del infarto de miocardio, con una linfopenia concomitante de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Luego aumentó el número de linfocitos circulantes a las 72 horas antes de regresar a la línea de base 7 días después del infarto de miocardio. El bloqueo de TREM-1 evitó los patrones cinéticos de estos linfocitos (Figura 11B).

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2), CX3CL1 (o Fractalkine) y MCP-3 (o CCL7) son quimiocinas importantes involucradas en el reclutamiento de monocitos Ly-6C<sup>alto</sup>, Ly-6C<sup>bajo</sup> y linfocitos a sitios inflamatorios, respectivamente. Las concentraciones plasmáticas de MCP-1, CX3CL1 y MCP-3 aumentaron 24 horas después del IM. Los niveles de MCP-1 y MCP-3 se redujeron notablemente en ratones tratados (Figura 11C).

7. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 modulan la reacción inflamatoria miocárdica durante el IM en ratones:

Luego investigamos si la modulación de TREM-1 por péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 puede regular la activación de las células inflamatorias infiltrantes. Las células inflamatorias que invaden rápidamente el miocardio después del infarto de miocardio se activan con la fosforilación de p38 MAPK y ERK 1/2, junto con una regulación positiva de la expresión de iNOS y COX2. Esta activación fue anulada en parte por los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (Figura 12). Cuando analizamos la cinética de la fosforilación/expresión de estas proteínas, los péptidos disminuyen sus niveles en todo momento (no se muestra). Por el contrario, varias proteínas involucradas en la supervivencia (AKT) o que se sabe que amortiguan la inflamación (SOCS3) fueron reguladas por todos los péptidos. Por ejemplo, el glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3β) desempeña un papel fundamental en la regulación de la producción de citocinas pro- y antiinflamatorias. En las células inmunes innatas, la inactivación de GSK3β (a través de la

fosforilación) suprime la producción de citocinas y se sabe que mejora la supervivencia de los cardiomiocitos. Aquí observamos que la fosforilación de GSK3 $\beta$  fue aumentada por los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 en comparación con los controles.

5 Como la actividad proinflamatoria celular parecía estar modulada por los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, a continuación, investigamos si se traduciría en una disminución de la producción de citocinas/quimiocinas.

10 Entre los 168 genes involucrados en la inmunidad innata o la función endotelial que examinamos a continuación, la expresión de 156 se alteró en el miocardio después de la ligadura de la arteria coronaria, principalmente a las 24 horas después del infarto de miocardio. La administración de LR12 se opone a la activación génica inducida por infarto de miocardio.

15 Como se esperaba, IM condujo a una producción robusta de varias citocinas (IL6, IL13, IL17, IL27, IFN $\gamma$ ) y quimiocinas (MIP2, JE). La concentración de estas proteínas se redujo mediante péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (Figura 13A). La PCR cuantitativa confirmó estos resultados a nivel genético (Figura 13B), especialmente después de 6 horas de IM.

20 Por lo tanto, la administración de péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 pudo modular la reacción inflamatoria del IM en áreas infartadas.

8. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 disminuyen la actividad de la proteasa en el tejido con infarto de miocardio:

25 Los neutrófilos y macrófagos infiltrantes expresan la metaloproteinasa de matriz 9 (Mmp-9) en el miocardio infartado. La actividad de Mmp-9 puede ser contrarrestada por el inhibidor tisular de la metaloproteinasa-1 (Timp-1). El mantenimiento del delicado equilibrio de estas 2 proteínas juega un papel crucial para prevenir la remodelación ventricular que conducirá a insuficiencia cardíaca. Aquí observamos que la expresión de ARNm Mmp-9 y Timp-1 aumentó en las áreas infartadas de los ratones de control. Por el contrario, la expresión de Mmp-9 permaneció baja en los animales tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, mientras que Timp-1 estaba impresionantemente regulado (Figura 14A, B). Por lo tanto, la relación Mmp-9/Timp-1 fue constantemente más alta en ratones de control. La actividad de gelatinasa Mmp-9 en las áreas infartadas fue constantemente mayor en los controles que en los ratones tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (Figura 14C).

35 Estos resultados soportan la hipótesis de que los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 pueden desempeñar un papel beneficioso en la preservación de la arquitectura cardíaca y en la oposición a la remodelación cardíaca después del IM.

9. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 mejoran la supervivencia después del IM en ratones:

40 A continuación, quisimos dilucidar si la administración de péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 podría tener algunos efectos protectores durante el IM. Los ratones Balb/c machos adultos se administraron ip al azar con dosis repetidas (100  $\mu$ g diarios durante 5 días) de péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1, o LR12 de secuencia aleatoria comenzando 60 minutos después de la ligadura permanente de la arteria coronaria. Todos los animales tratados con LR12 sobrevivieron, menos 1 (Figura 15), mientras que el 40 % de los ratones control murieron (prueba Log-Rank;  $p < 0.01$ ). Se obtuvieron resultados similares con los otros péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1.

50 Para investigar si un acoplamiento sostenido de TREM-1 podría ser aún más perjudicial, administramos ratones con un AcM agonista anti-TREM-1. Este tratamiento aumentó dramáticamente la tasa de mortalidad con solo un 20 % de sobrevivientes.

10. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 mejoran la función cardíaca después de la isquemia-reperusión miocárdica en ratas:

55 Para investigar el papel de los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 en un modelo más relevante de IM, realizamos una ligadura transitoria de la arteria coronaria (modelo de isquemia-reperusión: IR) en ratas. Después de la aleatorización, se tomaron imágenes de los animales bajo anestesia (micro-TEP) y se administraron con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (3 mg/kg al día durante 5 días i.p.) o péptido de secuencia aleatoria de LR12. Luego se repitieron las imágenes a las 6 semanas antes de estudiar la función cardíaca mediante el uso de un catéter de conductancia (Millar).

60 En el día 1, justo después del IR, ambos grupos fueron comparables. Las áreas infartadas eran moderadamente importantes y la función cardíaca estaba ligeramente alterada. A las 6 semanas, todas las ratas han mejorado con una curación de infarto casi completa y sin remodelación ventricular (Tabla 3). Por lo tanto, los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 no tuvieron efecto en los parámetros evaluados por micro-TEP. Por el contrario, cuando la función cardíaca fue investigada por un catéter de conductancia, observamos que los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 mejoraron drásticamente los parámetros sistólicos cruciales como Em $\acute{a}$ x o PRSW (Figura 16; Tabla 4).

Tabla 3: Resumen de parámetros fisiológicos durante la isquemia-reperfusión miocárdica en ratas.

	Controles (n=10)	LR12 (n=9)	Valor P	
<b>Inicial</b>				
5	Peso corporal (g)	410 ± 91	391 ± 9	0,53
	Presión sanguínea sistólica (mmHg)	136 ± 4	134 ± 2	0,10
	Frecuencia cardíaca (lpm)	338 ± 42	343 ± 43	0,78
10	Áreas de IM ( % de LV)	42 ± 28	41 ± 20	0,90
	EDV (µL)	486 ± 74	511 ± 55	0,41
	ESV (µL)	270 ± 59	251 ± 75	0,56
15	EF ( %)	44 ± 7	47 ± 6	0,47
<b>Seis semanas</b>				
	Peso corporal (g)	459 ± 63	439 ± 12	0,37
	- diferencia con la inicial	49 ± 18	48 ± 10	0,17
20	Presión sanguínea sistólica (mmHg)	170 ± 5	167 ± 6	0,16
	- diferencia con la inicial	34 ± 3	33 ± 6	0,73
	Frecuencia cardíaca (lpm)	350 ± 55	370 ± 25	0,36
25	- diferencia con la inicial	12 ± 23	27 ± 22	0,28
	Áreas de IM ( % de LV)	5 ± 10	3 ± 9	0,63
	- diferencia con la inicial	-37 ± 15	-38 ± 8	0,61
30	EDV (µL)	560 ± 58	620 ± 34	0,11
	- diferencia con la inicial	74 ± 37	109 ± 55	0,13
	ESV (µL)	251 ± 50	273 ± 47	0,18
	- diferencia con la inicial	-19 ± 8	22 ± 18	0,47
35	EF ( %)	55 ± 8	56 ± 5	0,73
	- diferencia con la inicial	11 ± 8	9 ± 7	0,74

Tabla 4: Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 mejoran la función cardíaca después de la isquemia-reperfusión miocárdica en ratas.

	Emáx	ESPVR	PRSW	
45	Vehículo	2,8 ± 0,3	1 ± 0,2	68 ± 11
	TLT1-LR17	5,1 ± 0,6	2 ± 0,2	105 ± 6
	TLT1-LR12	4,8 ± 0,5	2,2 ± 0,1	103 ± 5
50	TLT1-LR6-1	4,5 ± 0,6	2,4 ± 0,4	102 ± 6
	TLT1-LR6-2	6,5 ± 0,9	1,8 ± 0,1	99 ± 8
	TLT-1LR6-3	5,2 ± 0,4	1,7 ± 0,3	109 ± 6
55	TREM1-LP17	5,9 ± 0,8	2,2 ± 0,3	110 ± 5
	TREM1-LP12	4,5 ± 0,4	2,3 ± 0,4	99 ± 4
	TREM1-LP6-1	5,5 ± 0,4	2 ± 0,3	105 ± 6
	TREM1-LP6-2	6 ± 0,6	2,2 ± 0,1	104 ± 5
60	TREM1-LP6-3	5,8 ± 0,5	2,3 ± 0,4	99 ± 8
	TLT-1-LR12scr	2,7 ± 0,3	1,1 ± 0,3	65 ± 8

Por lo tanto, incluso durante este modelo relativamente leve de isquemia miocárdica, la administración de péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 pudo restaurar la función cardíaca sistólica.

11. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 mejoran las funciones sistólicas y diastólicas después del infarto de miocardio en ratas:

5 Finalmente investigamos si la modulación de la respuesta inflamatoria conferida por los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 pudo traducirse en una mejora de la función cardíaca después de un IM grave. Realizamos una ligadura permanente de la arteria coronaria en ratas antes de la aleatorización y la obtención de imágenes como se describió anteriormente.

10 Una vez más, en el día 1, ambos grupos fueron perfectamente similares. A las 6 semanas, se ha producido una remodelación cardíaca importante según lo evaluado por la presencia de una dilatación ventricular importante. Esta remodelación cardíaca fue, al menos en parte, alterada por los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (Tabla 5). Como marcador indirecto de insuficiencia cardíaca, los animales de control ganaron más peso que las ratas tratadas con todos los péptidos.

15 Tabla 5: Parámetros fisiológicos seleccionados después del infarto de miocardio en ratas.

	Controles (n=18)	LR12 (n=17)	Valor p	
<b>Inicial</b>				
20	Peso corporal (g)	303 ± 42	313 ± 51	0,32
	Presión sanguínea sistólica (mmHg)	134 ± 15	136 ± 17	0,76
	Frecuencia cardíaca (lpm)	378 ± 39	400 ± 26	0,07
	Áreas de IM ( % de LV)	23 ± 9	22 ± 11	0,88
25	Áreas IM (mm <sup>2</sup> )	57 ± 27	54 ± 30	0,88
	EDV (µL)	431 ± 75	417 ± 92	0,30
	ESV (µL)	223 ± 51	215 ± 62	0,23
30	EF ( %)	48 ± 8	48 ± 9	0,81
<b>Seis semanas</b>				
	Peso corporal (g)	447 ± 28	426 ± 49	0,26
35	- diferencia con la inicial	144 ± 44	113 ± 51	<b>0,05</b>
	Presión sanguínea sistólica (mmHg)	135 ± 15	136 ± 17	0,76
	- diferencia con la inicial	-9 ± 23	-12 ± 26	0,37
	Frecuencia cardíaca (lpm)	372 ± 37	393 ± 23	0,03
40	- diferencia con la inicial	-6 ± 31	-8 ± 22	0,91
	Áreas de IM ( % de LV)	15 ± 9	16 ± 11	0,81
	- diferencia con la inicial	-8,2 ± 5,9	-6,0 ± 8,1	0,11
45	Áreas IM (mm <sup>2</sup> )	48 ± 29	49 ± 40	0,81
	- diferencia con la inicial	-9 ± 20	-5 ± 23	0,11
	EDV (µL)	704 ± 93	615 ± 161	<b>0,007</b>
	- diferencia con la inicial	273 ± 77	198 ± 95	<b>0,007</b>
50	ESV (µL)	365 ± 77	313 ± 128	<b>0,02</b>
	- diferencia con la inicial	143 ± 60	99 ± 80	0,06
	EF ( %)	49 ± 7	50 ± 8	0,61
55	- diferencia con la inicial	0 ± 8	2 ± 7	0,44

60 Cuando se investigó la función cardíaca mediante un catéter de conductancia, observamos que los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 mejoraron drásticamente los parámetros sistólicos y diastólicos cruciales como Emáx, ESPVR, PRSW, dP/dTmin, dP/dTmax y Ved (Figura 17).

Tomados en conjunto, estos datos soportan el papel protector de los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 en la prevención de la remodelación cardíaca y la insuficiencia después de un infarto de miocardio.

65 12. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 previenen el desarrollo de aterosclerosis en ratones:

Las placas ateroscleróticas se tiñeron con aceite rojo y se cuantificaron en el seno aórtico. Curiosamente, el tratamiento con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 indujo una reducción significativa del 30 % del tamaño de la lesión en el seno aórtico (103318  $\mu\text{m}^2$  versus 146736  $\mu\text{m}^2$ ,  $p=0,02$ ) (Figura 18). Este resultado se confirmó en un segundo conjunto de experimentos.

5 13. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 alteran la composición celular de la placa ateromatosa:  
Mediante el uso de tinción inmunofluorescente e inmunohistoquímica, analizamos la composición de la placa. No observamos ninguna diferencia con respecto a la infiltración de linfocitos (anticuerpo anti-CD3) y la acumulación de colágeno (Sirius Red) entre los grupos. Sin embargo, encontramos una reducción significativa del 27 % de la infiltración de macrófagos dentro de las lesiones ateroscleróticas de ratones tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (Figura 19).

15 14. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 modifican la población de leucocitos sanguíneos en ratones ateroscleróticos:

Mediante el uso de citometría de flujo, analizamos poblaciones de leucocitos en sangre. Los monocitos clásicos fueron CD115+Gr1high y los monocitos no clásicos fueron CD115+Gr1low. En los ratones apoE-/- bajo una dieta de alimentación, solo los monocitos no clásicos expresaron TREM. Curiosamente, la dieta alta en grasas aumentó la expresión de TREM-1 en monocitos no clásicos (datos no mostrados).

Luego, analizamos las poblaciones de leucocitos en sangre durante el tratamiento. En el día 7, observamos una reducción significativa de monocitos no clásicos en la sangre de ratones tratados con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 (Figura 20). En el día 28, observamos una reducción significativa de monocitos clásicos y no clásicos en la sangre (Figura 21).

15. Los péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 disminuyen el reclutamiento de monocitos a las placas ateroscleróticas:

30 Finalmente, exploramos los efectos del tratamiento con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 sobre el reclutamiento de monocitos en las placas ateroscleróticas. Utilizamos la técnica de tinción de pulso desarrollada por Potteaux y otros. Brevemente, los monocitos se marcaron in vivo mediante inyección retro-orbital i.v. de microesferas llanas fluorescentes verdes Fluoresbrite de 1  $\mu\text{m}$  diluidas 1:4 en PBS estéril [Ait-Oufella H. y otros, 2011]. El conteo de cuentas fluorescentes en las lesiones refleja el reclutamiento de monocitos. Se inyectaron cuentas 24 horas antes del sacrificio de los ratones apoE-/- tratados. Curiosamente, encontramos una reducción significativa de la infiltración de monocitos en el grupo tratado con péptidos derivados de TREM-1 y TLT-1 en comparación con el grupo control (Figura 22).

#### 40 Referencias

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 (5):969-979 (2011).

45 Bjorkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordijia CM, Lee MA, Means T, Halmen K., Luster AD., Golenbock DT., Freeman MW. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 10 (4):416-421(2004).

50 Daqing W. Hartwell., Tanya N. Mayadas., Gaëtan Berger., Paul S. Frenette., Helen Rayburn., Richard O. Hynes., Denisa D. Wagner. Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *Journal of Cell Biology*; 143 4:1129 1141 (1998).

Derive M, Bouazza Y, Sennoun N, Marchionni S, Quigley L, Washington V, Massin F, Max JP, Ford J, Alauzet C, Levy B, McVicar DW, Gibot S. Soluble TREM-like transcript-1 regulates leukocyte activation and controls microbial sepsis. *J Immunol.* 2012 Jun 1;188(11):5585-92. Epub 2012 May 2.

Entman M.L., Smith C.W. Postreperfusion inflammation. A model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 9:1301-1311 (1994).

60 Hara H, Saito T. CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* ;30:234-242 (2009).

Harjot K Saini., Yan-Jun Xu., Ming Zhang., Peter P Liu., Lorrie A Kirshenbaum., Naranjan SDhalla. Role of tumour necrosis factor-alpha and other cytokines in ischemia-reperfusion-induced injury in the heart. *Exp Clin Cardiol.* 2005 Winter; 10(4): 213-222.

65 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420 (6917):868-874 (2002).

Mehta J.L., Li D.Y. Inflammation in ischemic heart disease: response to tissue injury or a pathogenetic villain. *Cardiovasc Res*;2:291-299 (1999).

5 Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204, 3037-3047 (2007).

10 Potteaux S, Gautier EL, Hutchison SB, van Rooijen N, Rader DJ, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG, Randolph GJ. Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe<sup>-/-</sup> mice during disease regression. *J Clin Invest* 121 (5):2025-2036 (2011). doi:43802 [pii]10.1172/JCI43802.

Radsak MP, Salih HR, Rammensee H, Schild H. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival. *J. Immunol*;172:4956-4963 (2004).

15 Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, Figueiredo JL, Kohler RH, Chudnovskiy A, Waterman P, Aikawa E, Mempel TR, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616 (2009).

20 Washington AV, Gibot S, Acevedo I, Gattis J, Quigley L, Feltz R, De La Mota A, Schubert RL, Gomez-Rodriguez J, Cheng J, Dutra A, Pak E, Chertov O, Rivera L, Morales J, Lubkowski J, Hunter R, Schwartzberg PL, McVicar DW. TREM-like transcript-1 protects against inflammation-associated hemorrhage by facilitating platelet aggregation in mice and humans. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1489-5.

Listado de Secuencias

25 <110> INSERM ; Université de Lorraine

<120> PÉPTIDOS INHIBITORIOS DERIVADOS DEL RECEPTOR DESENCADENANTE EXPRESADO EN CÉLULAS MIELOIDES-1 (TREM-1) Y DEL TRANSCRITO SIMILAR A TREM 1 (TLT-1) Y SUS USOS

30 <130> 303/PCT

<160> 13

35 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 311

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 1

45

50

55

60

65

ES 2 797 625 T3

1 Met Gly Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Glu Gly Gln  
 5 Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val Leu Gln Ala Pro Val Gly Ser  
 10 Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln  
 15 Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser  
 20 Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr  
 25 Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro  
 30 Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu Glu  
 35 Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser Asp  
 40 Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys Ser  
 45 Ile Pro Leu Ile Trp Gly Ala Val Leu Leu Val Gly Leu Leu Val Ala  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 797 625 T3

Ala Val Val Leu Phe Ala Val Met Ala Lys Arg Lys Gln Gly Asn Arg  
 180 185 190

5 Leu Gly Val Cys Gly Arg Phe Leu Ser Ser Arg Val Ser Gly Met Asn  
 195 200 205

10 Pro Ser Ser Val Val His His Val Ser Asp Ser Gly Pro Ala Ala Glu  
 210 215 220

15 Leu Pro Leu Asp Val Pro His Ile Arg Leu Asp Ser Pro Pro Ser Phe  
 225 230 235 240

20 Asp Asn Thr Thr Tyr Thr Ser Leu Pro Leu Asp Ser Pro Ser Gly Lys  
 245 250 255

25 Pro Ser Leu Pro Ala Pro Ser Ser Leu Pro Pro Leu Pro Pro Lys Val  
 260 265 270

30 Leu Val Cys Ser Lys Pro Val Thr Tyr Ala Thr Val Ile Phe Pro Gly  
 275 280 285

35 Gly Asn Lys Gly Gly Gly Thr Ser Cys Gly Pro Ala Gln Asn Pro Pro  
 290 295 300

40 Asn Asn Gln Thr Pro Ser Ser  
 305 310

<210> 2  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

45 Met Arg Lys Thr Arg Leu Trp Gly Leu Leu Trp Met Leu Phe Val Ser  
 1 5 10 15

50 Glu Leu Arg Ala Ala Thr Lys Leu Thr Glu Glu Lys Tyr Glu Leu Lys  
 20 25 30

55 Glu Gly Gln Thr Leu Asp Val Lys Cys Asp Tyr Thr Leu Glu Lys Phe  
 35 40 45

60 Ala Ser Ser Gln Lys Ala Trp Gln Ile Ile Arg Asp Gly Glu Met Pro  
 50 55 60

65 Lys Thr Leu Ala Cys Thr Glu Arg Pro Ser Lys Asn Ser His Pro Val  
 65 70 75 80

ES 2 797 625 T3

5 Gln Val Gly Arg Ile Ile Leu Glu Asp Tyr His Asp His Gly Leu Leu  
 85 90 95  
 Arg Val Arg Met Val Asn Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln  
 100 105 110  
 10 Cys Val Ile Tyr Gln Pro Pro Lys Glu Pro His Met Leu Phe Asp Arg  
 115 120 125  
 Ile Arg Leu Val Val Thr Lys Gly Phe Ser Gly Thr Pro Gly Ser Asn  
 130 135 140  
 15 Glu Asn Ser Thr Gln Asn Val Tyr Lys Ile Pro Pro Thr Thr Thr Lys  
 145 150 155 160  
 20 Ala Leu Cys Pro Leu Tyr Thr Ser Pro Arg Thr Val Thr Gln Ala Pro  
 165 170 175  
 Pro Lys Ser Thr Ala Asp Val Ser Thr Pro Asp Ser Glu Ile Asn Leu  
 180 185 190  
 25 Thr Asn Val Thr Asp Ile Ile Arg Val Pro Val Phe Asn Ile Val Ile  
 195 200 205  
 30 Leu Leu Ala Gly Gly Phe Leu Ser Lys Ser Leu Val Phe Ser Val Leu  
 210 215 220  
 35 Phe Ala Val Thr Leu Arg Ser Phe Val Pro  
 225 230

<210> 3  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

45 Leu Gln Glu Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Arg

50 <210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 4

Leu Gln Glu Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met  
 1 5 10

60 <210> 5  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

65

ES 2 797 625 T3

<400> 5

Leu Gln Glu Glu Asp Ala  
1 5

5 <210> 6  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10 <400> 6

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr  
1 5

15 <210> 7  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <400> 7

Gly Glu Tyr Gly Cys Met  
1 5

25 <210> 8  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

30 <400> 8

Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val Ile Tyr Gln Pro  
1 5 10 15

35 Pro

<210> 9  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

40 <400> 9

Leu Gln Val Glu Asp Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Val  
1 5 10

45 <210> 10  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50 <400> 10

Leu Gln Val Glu Asp Ser  
1 5

55 <210> 11  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

60 <400> 11

Glu Asp Ser Gly Leu Tyr  
1 5

65 <210> 12

ES 2 797 625 T3

<211> 6  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<400> 12

5

Gly Leu Tyr Gln Cys Val  
1 5

<210> 13  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> peptide scramble

15

<400> 13

20

Glu Leu Met Glu Gly Gly Gln Glu Cys Ala Asp Tyr  
1 5 10

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido de menos de 50 aminoácidos que comprende al menos 6 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, en donde la enfermedad cardiovascular se selecciona de un infarto del miocardio o cerebral, infarto agudo de miocardio, enfermedad coronaria, síndrome coronario agudo, accidente cerebro-vascular, aneurisma, angina de pecho estable o de esfuerzo, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca hipertensiva, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda, cor pulmonale, disritmias cardíacas, enfermedad cardíaca inflamatoria tal como endocarditis, miocarditis, enfermedad arterial periférica, disfunción vascular y miocárdica asociada a SIRS y aterosclerosis.
- 10 2. El péptido para usar de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de 6 aminoácidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 7.
- 15 3. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4.
- 20 4. El péptido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una longitud de 6 a 20 aminoácidos.
- 25 5. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 4, que consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.
- 30 6. El péptido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 4.
- 35 7. El péptido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la enfermedad cardiovascular es un infarto del miocardio.
8. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la enfermedad cardiovascular es la aterosclerosis.
9. El péptido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho péptido debe inyectarse a un sujeto que lo necesite.
- 40 10. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho péptido se administrará en combinación con uno o más de otros compuestos contra enfermedades cardiovasculares.
11. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho uno o más de otros compuestos contra enfermedades cardiovasculares se seleccionan de compuestos de estatina, enfoques anticoagulantes, compuestos anti-aldosterona, inhibidores de la ECA y bloqueadores beta.

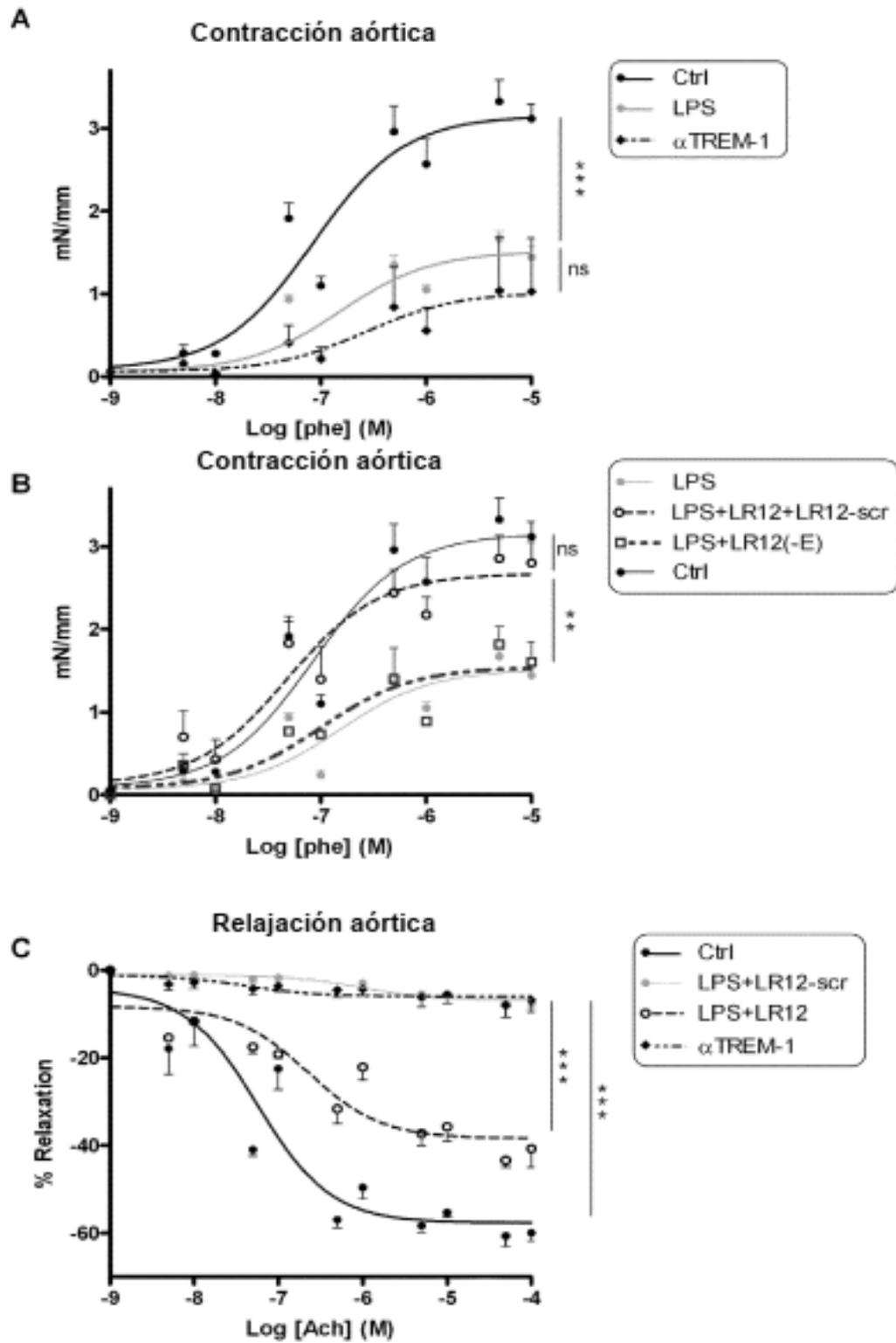


FIGURA 1

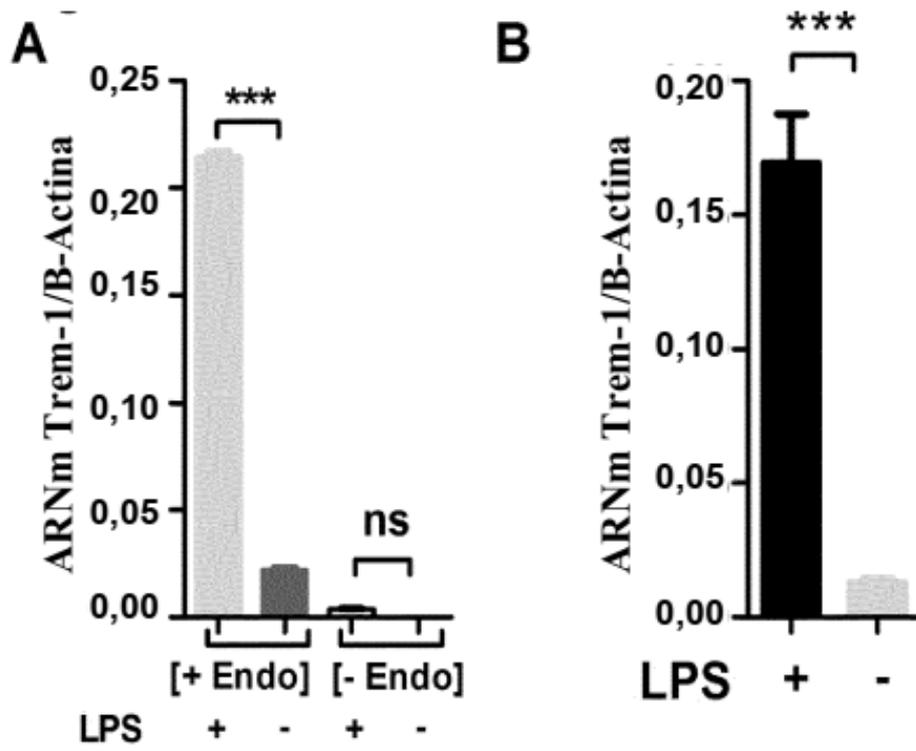


FIGURA 2

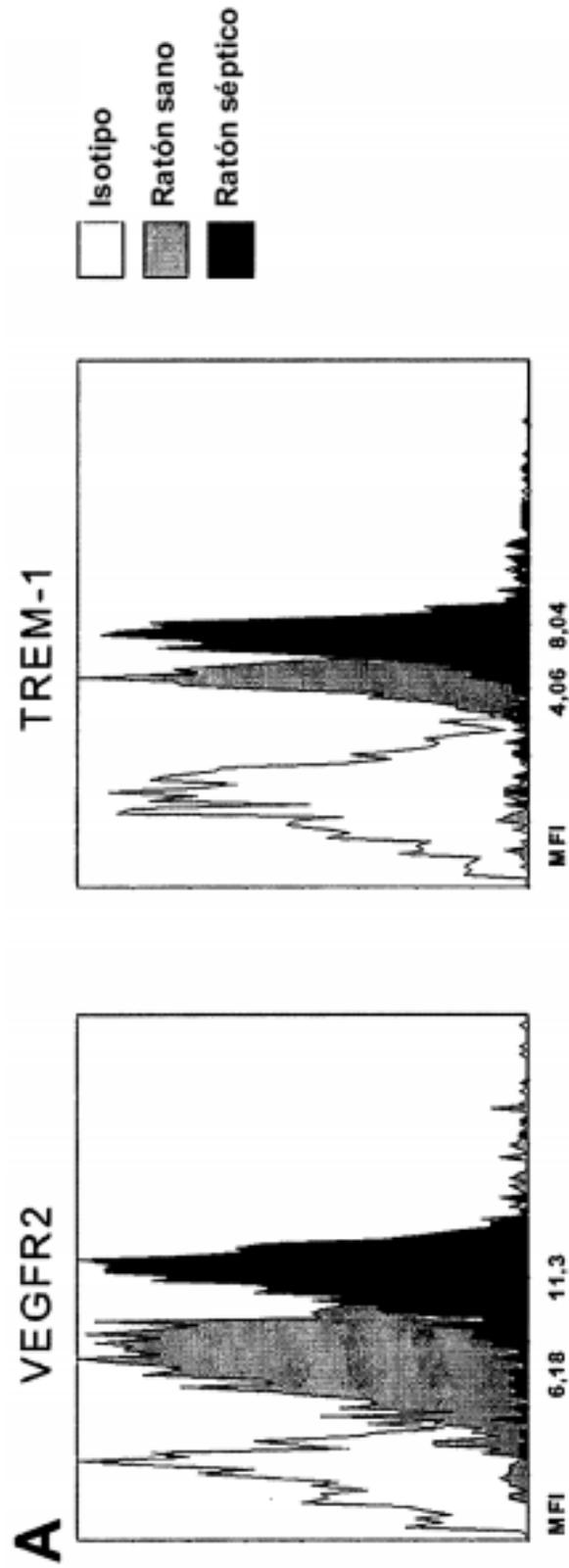


FIGURA 3

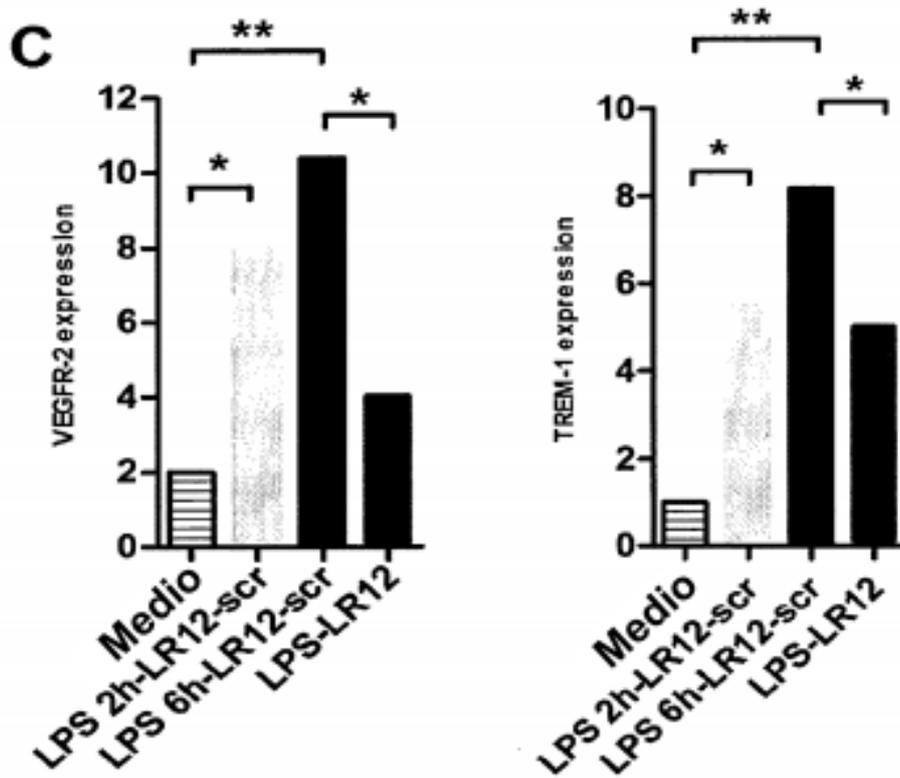
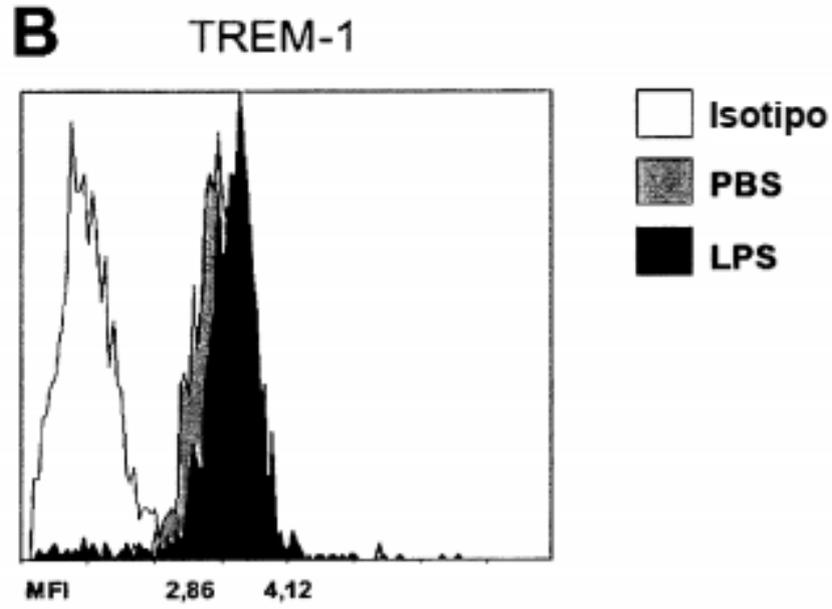


FIGURA 3 (cont.)

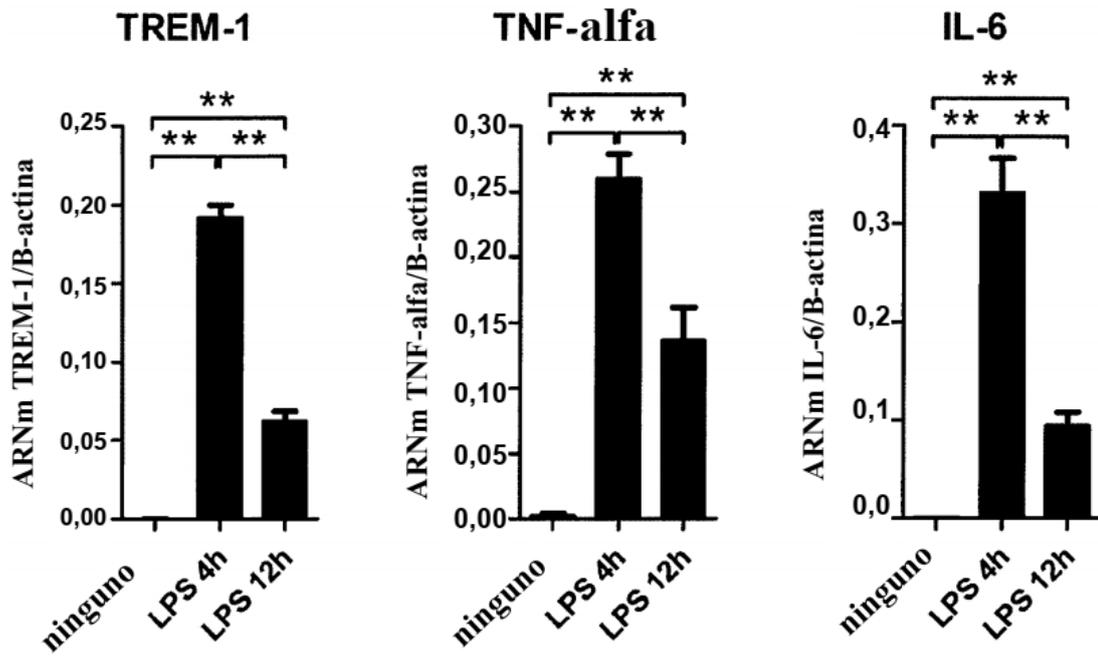


FIGURA 4

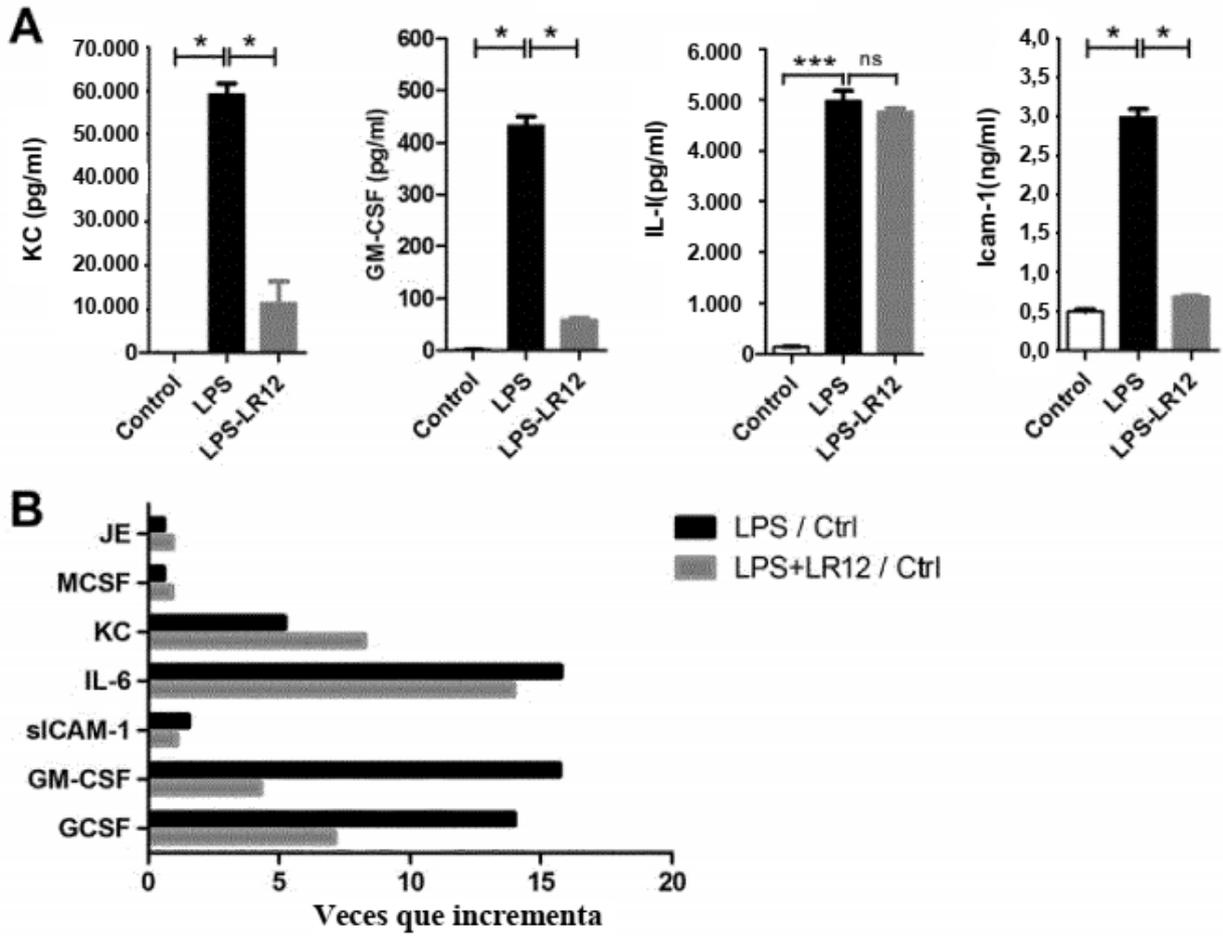


FIGURA 5

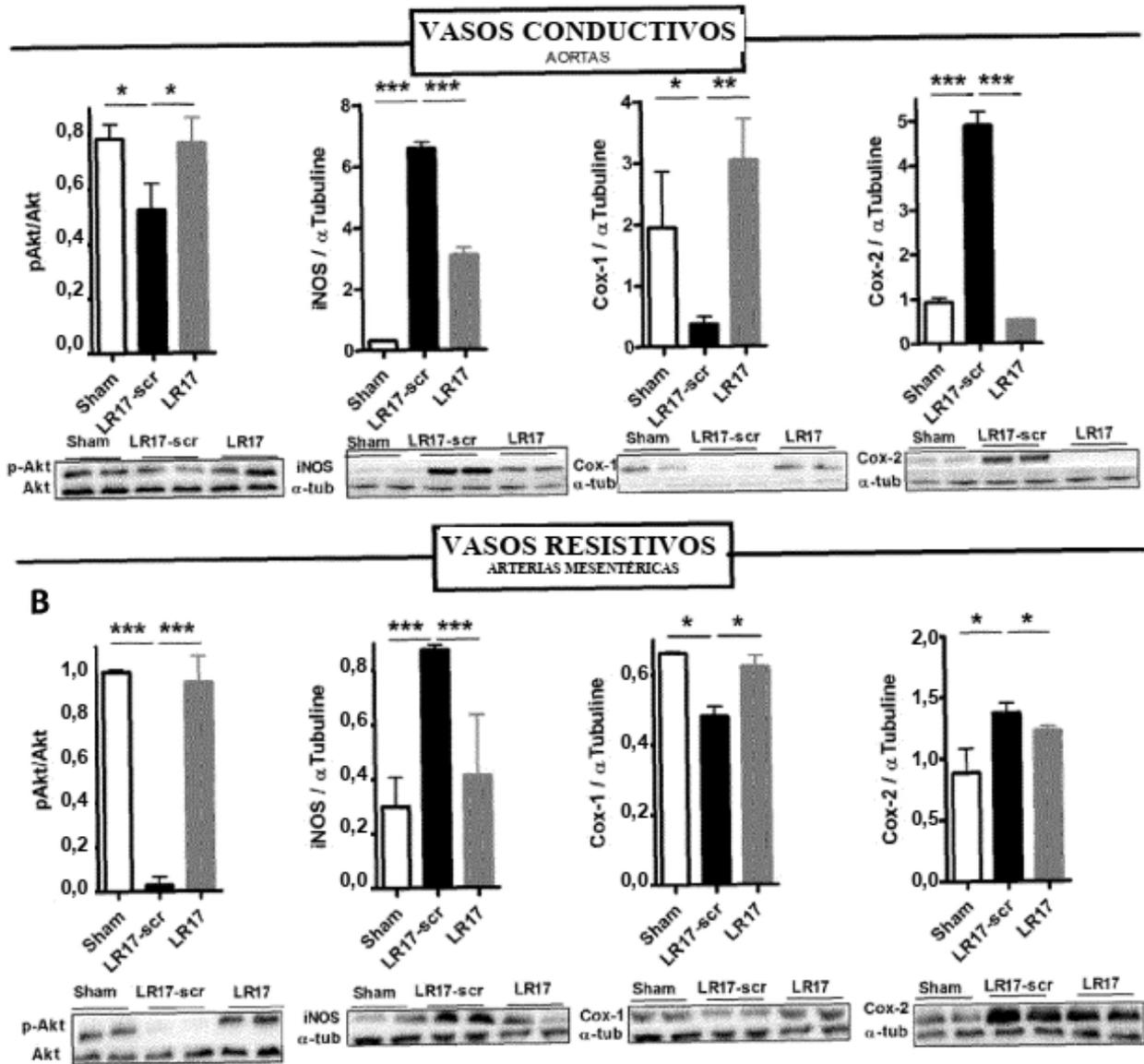


FIGURA 6

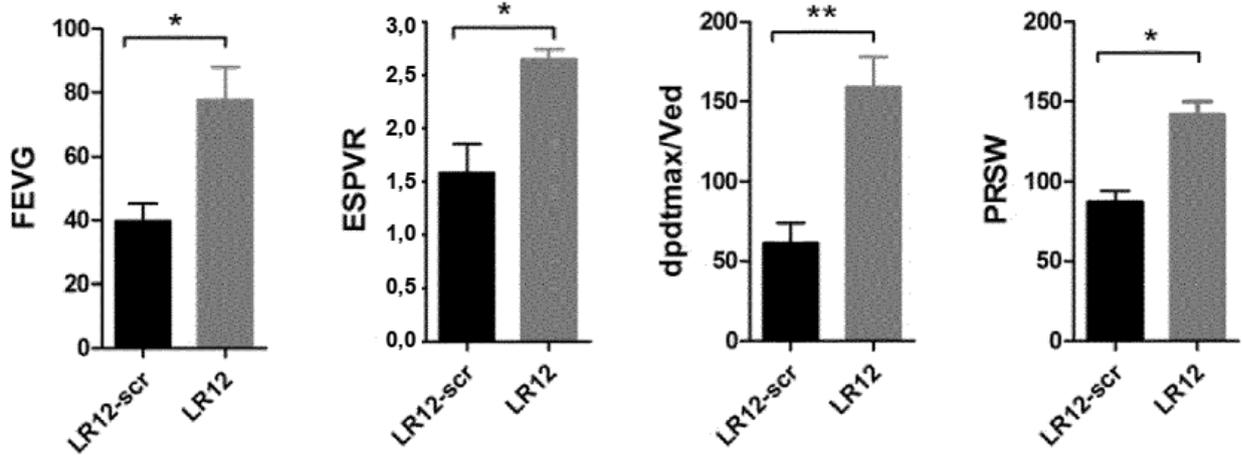


FIGURA 7

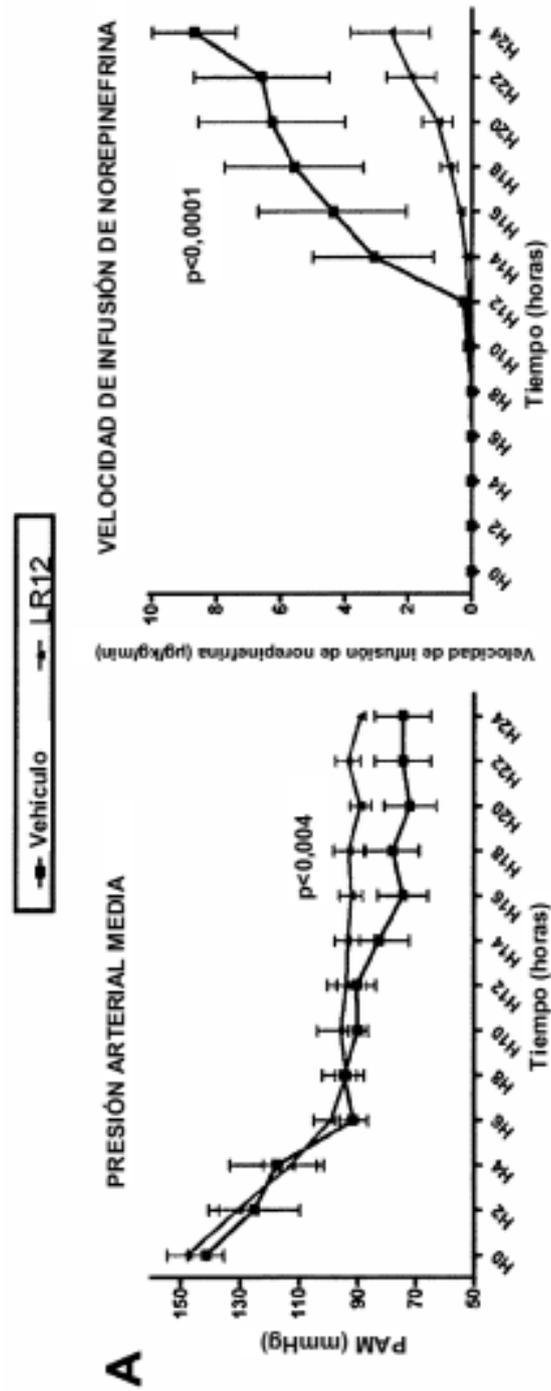


FIGURA 8

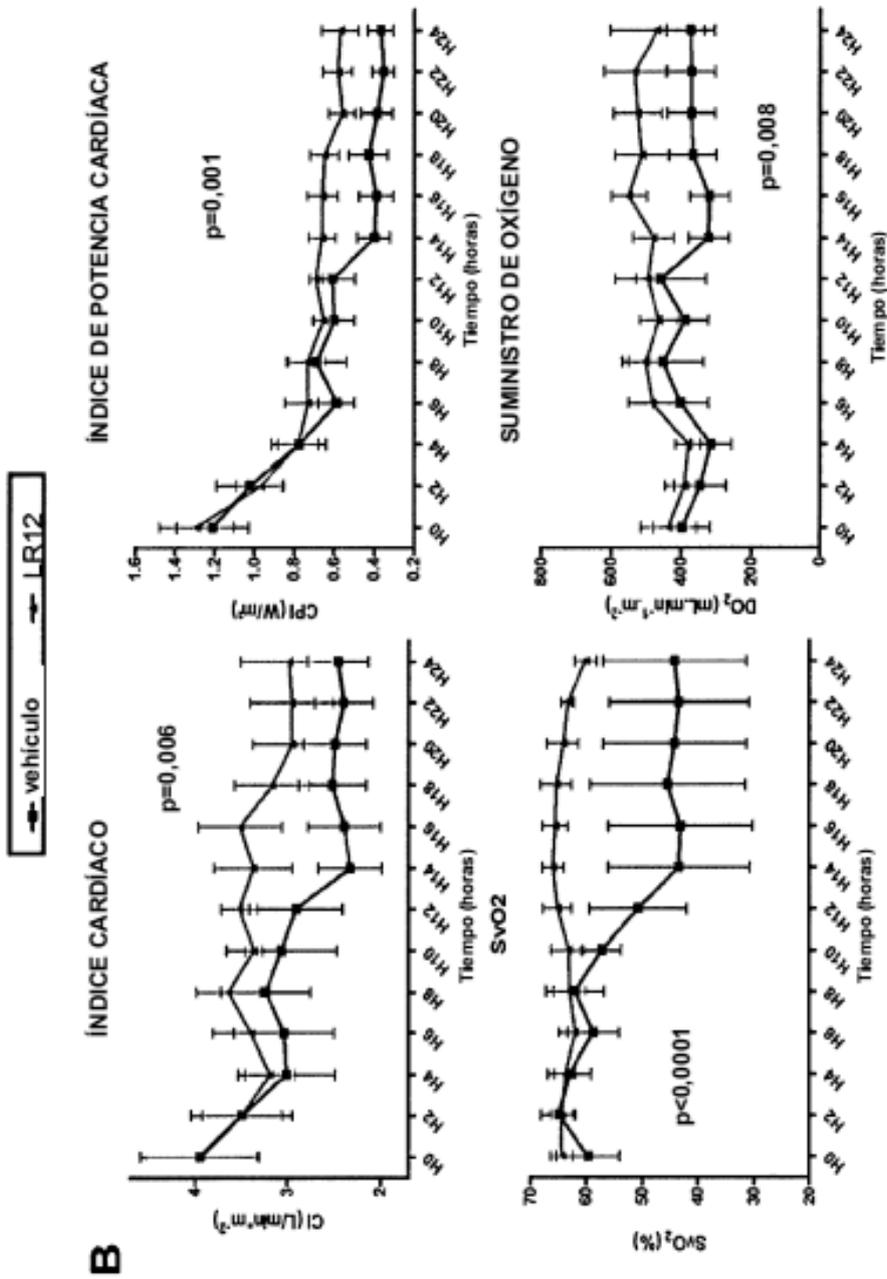


FIGURA 8 (cont.)

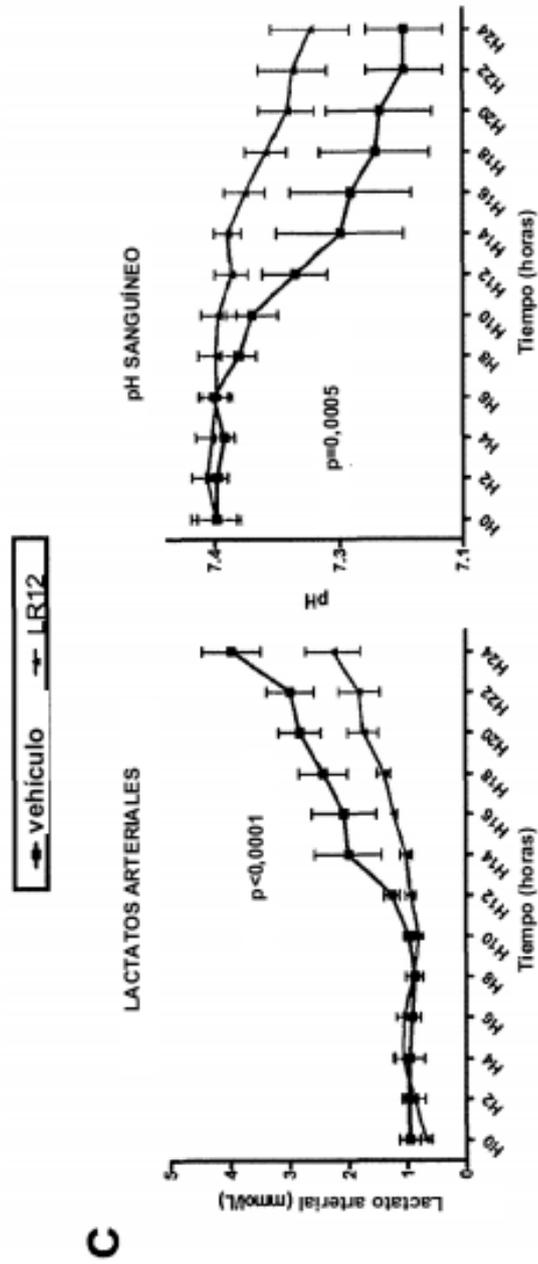


FIGURA 8 (cont.)

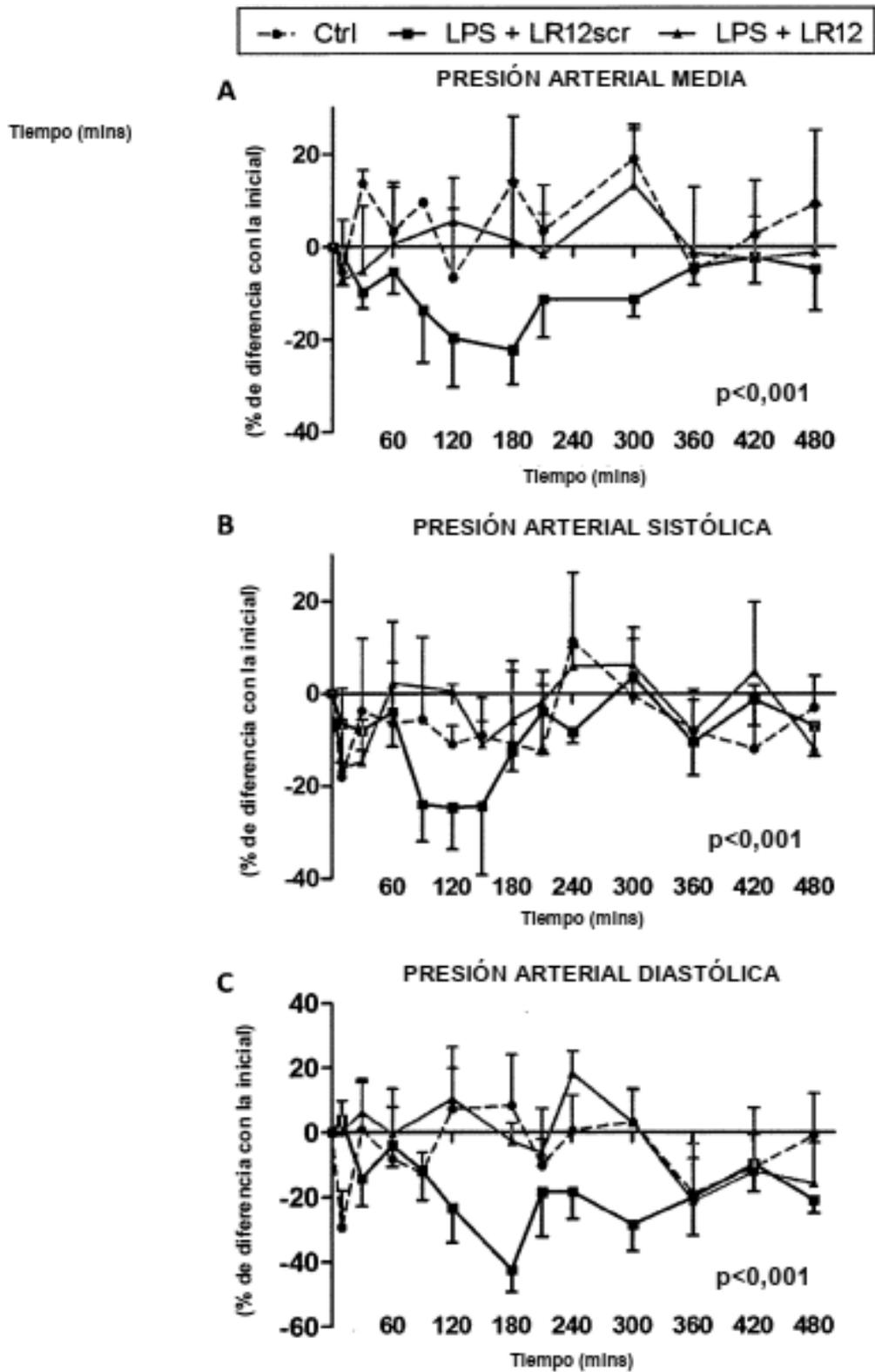


FIGURA 9

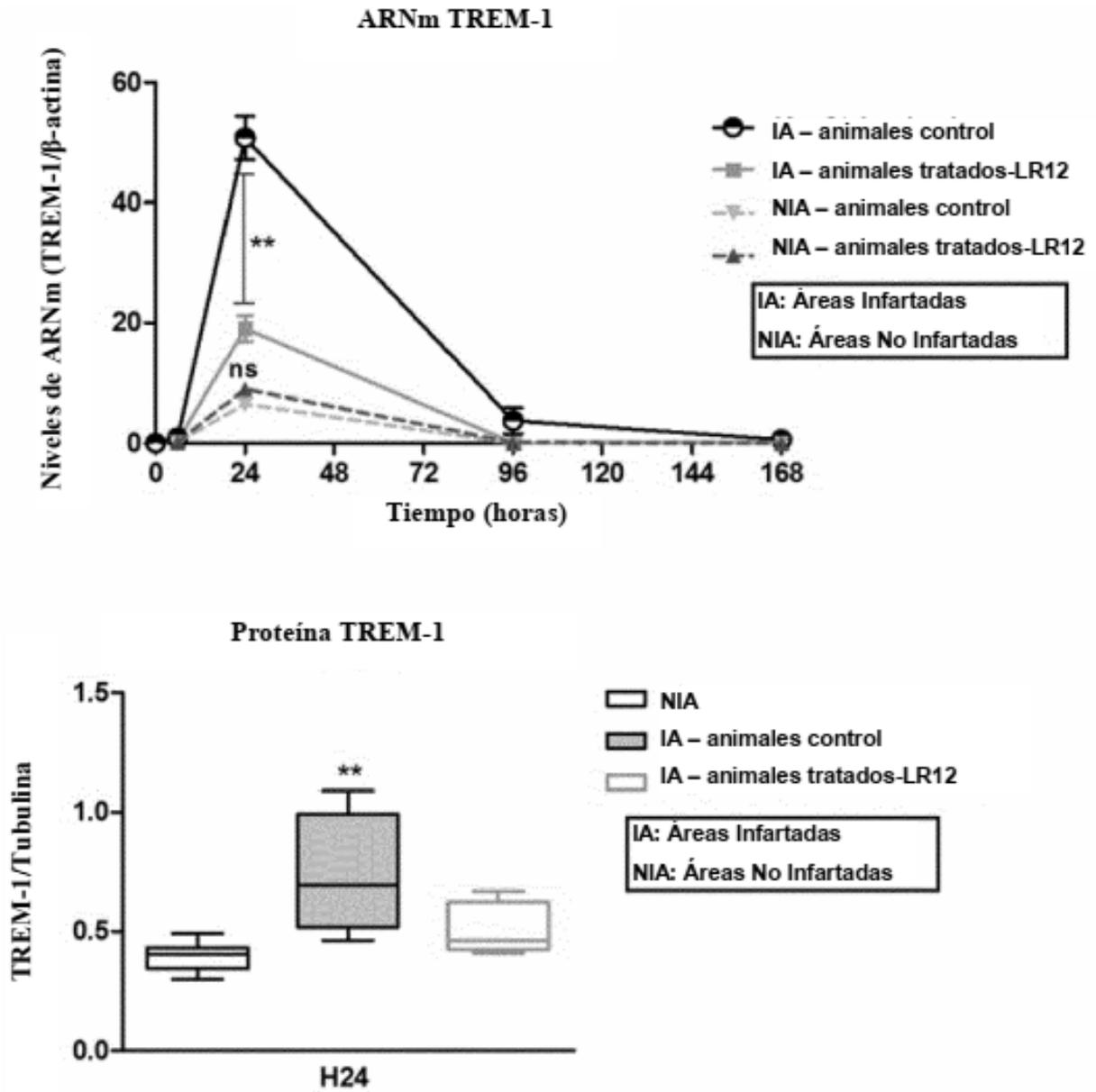


FIGURA 10

A

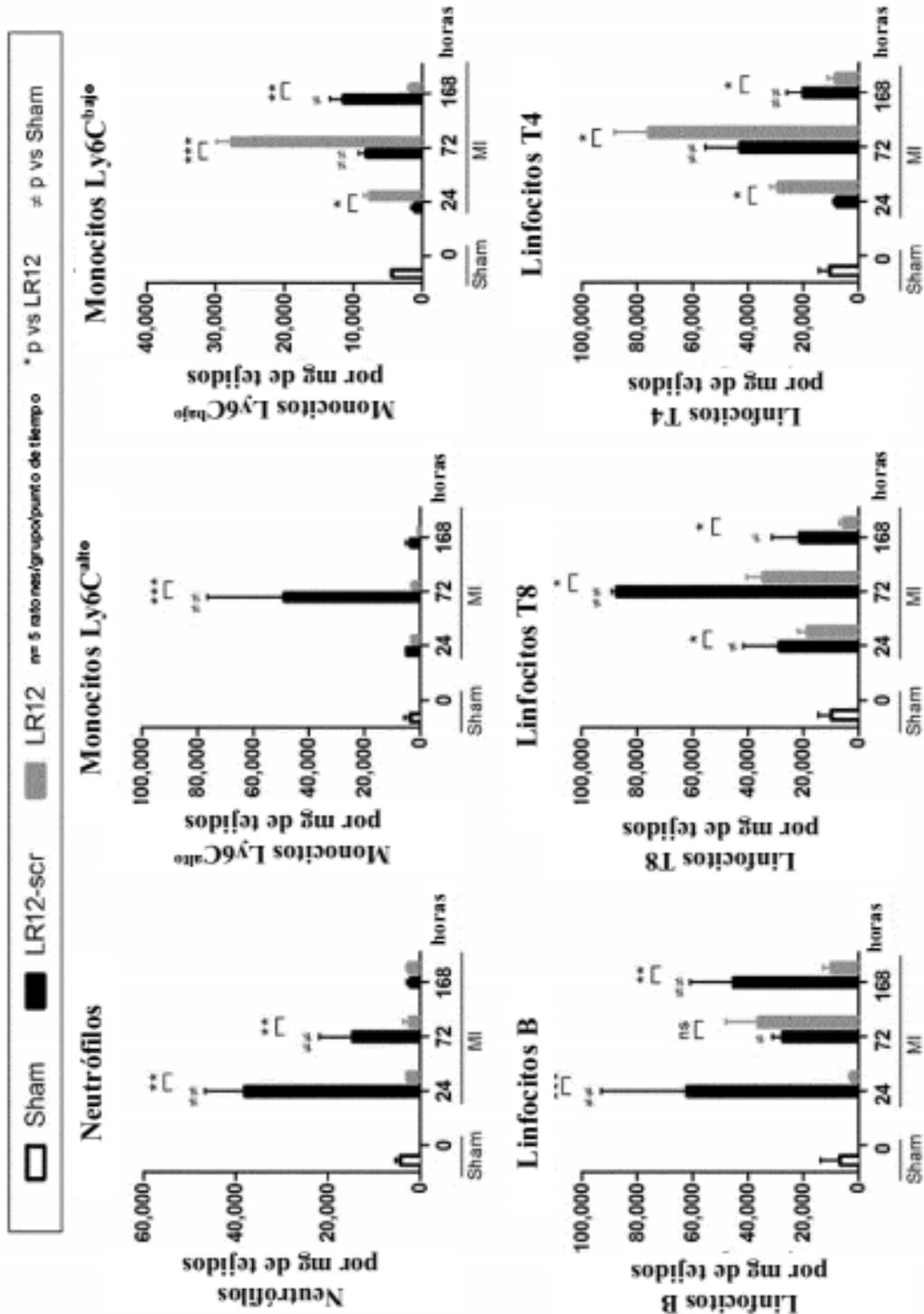


FIGURA 11

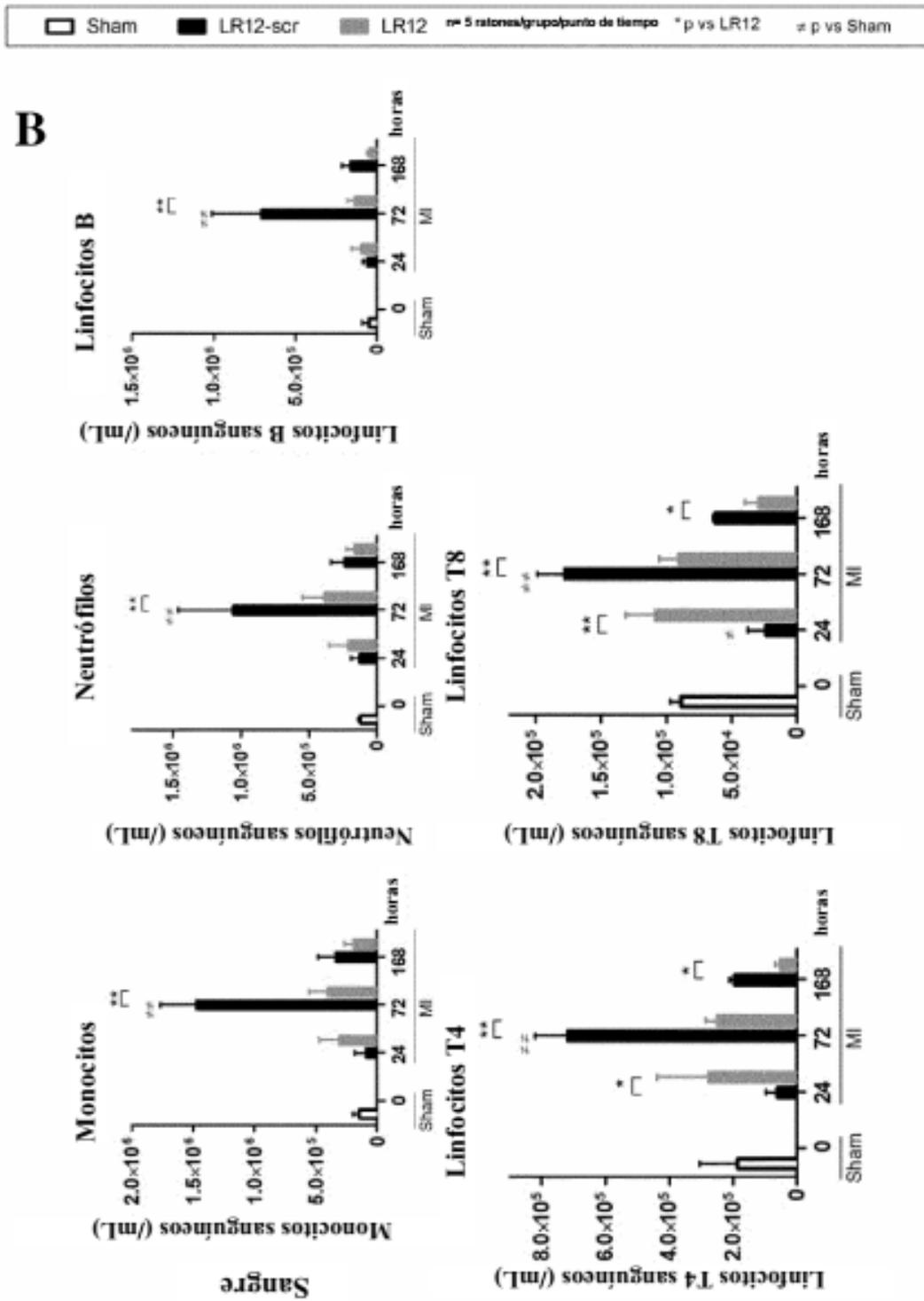
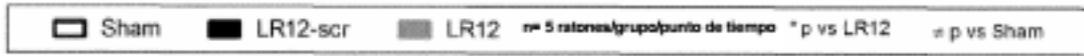


FIGURA 11 (cont)



**B**

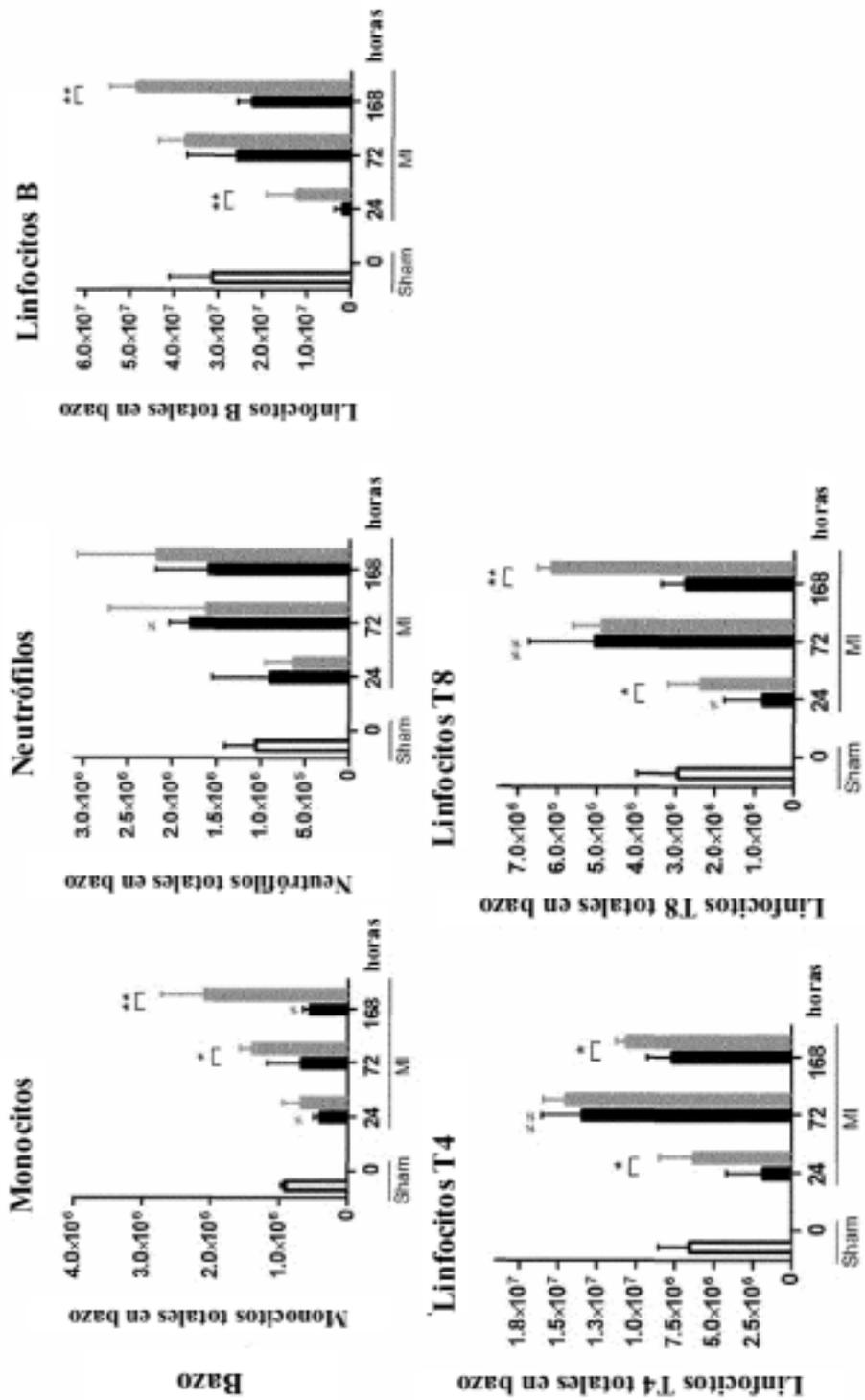
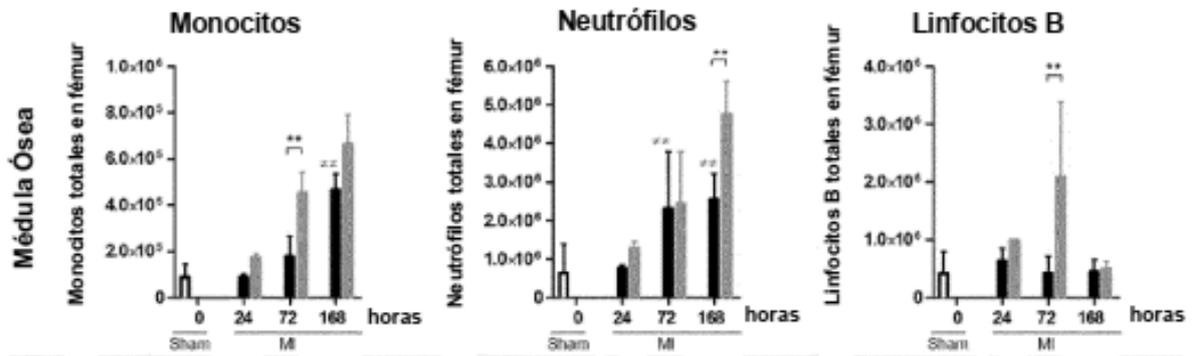


FIGURA 11 (cont)

**B**



**C**

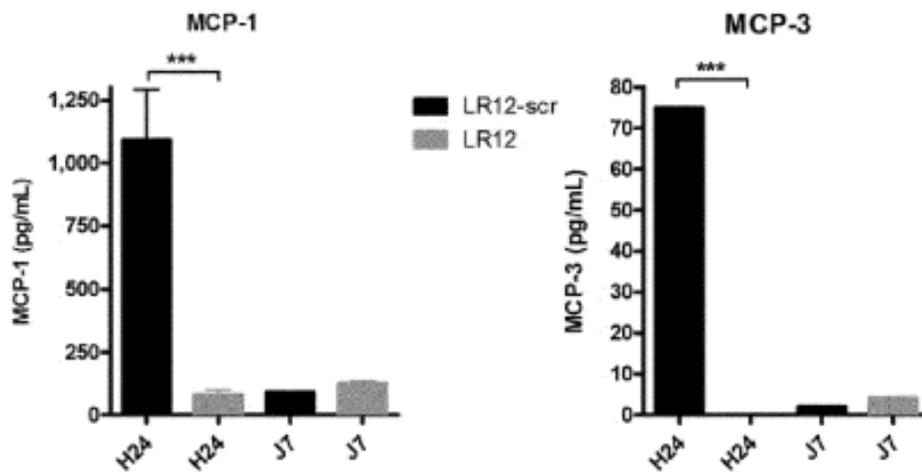


FIGURA 11 (cont)

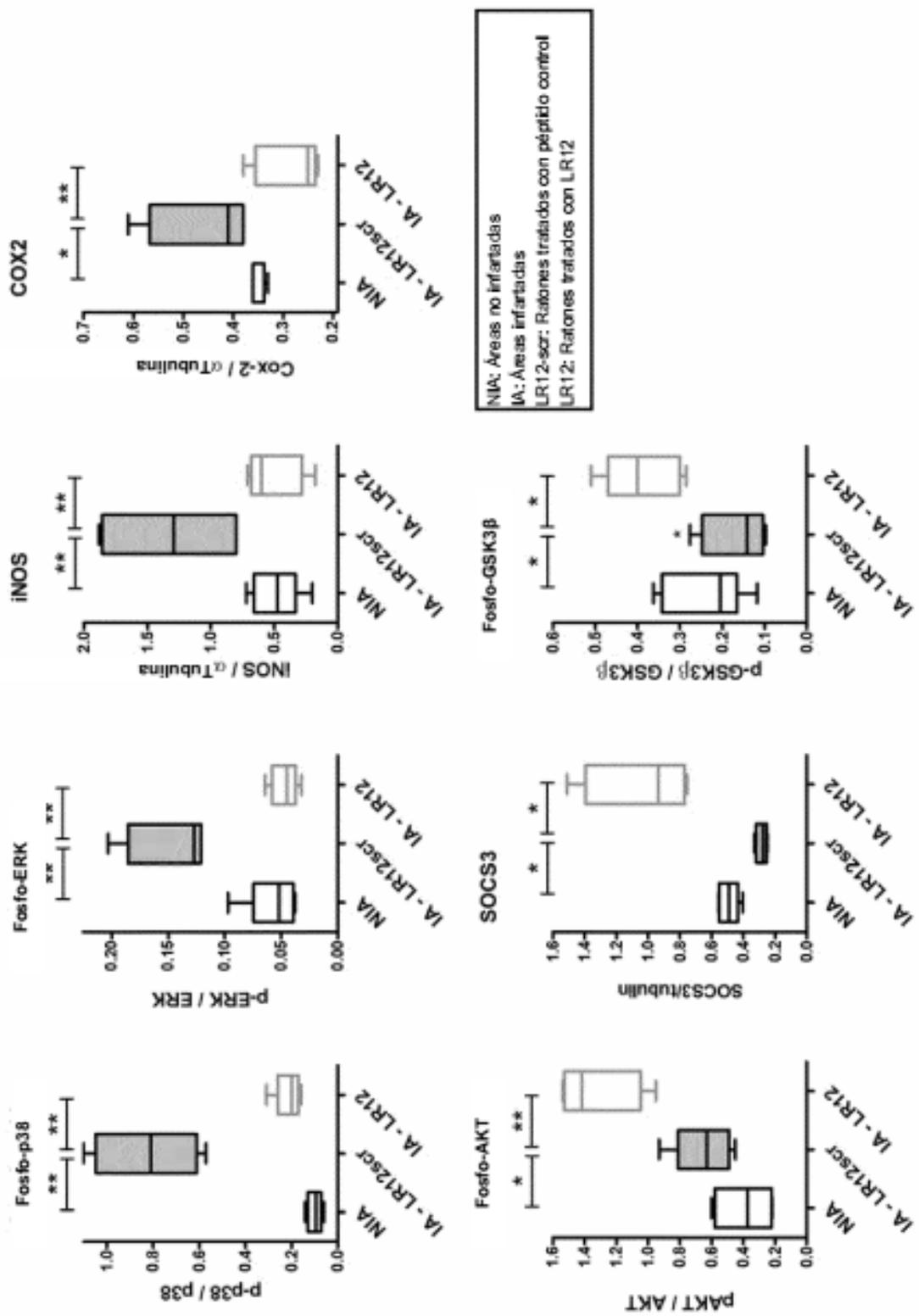
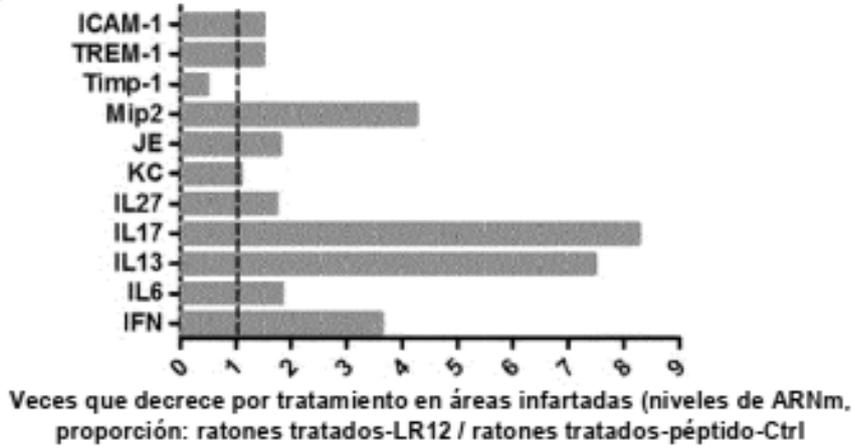


FIGURA 12

**A**



**B**

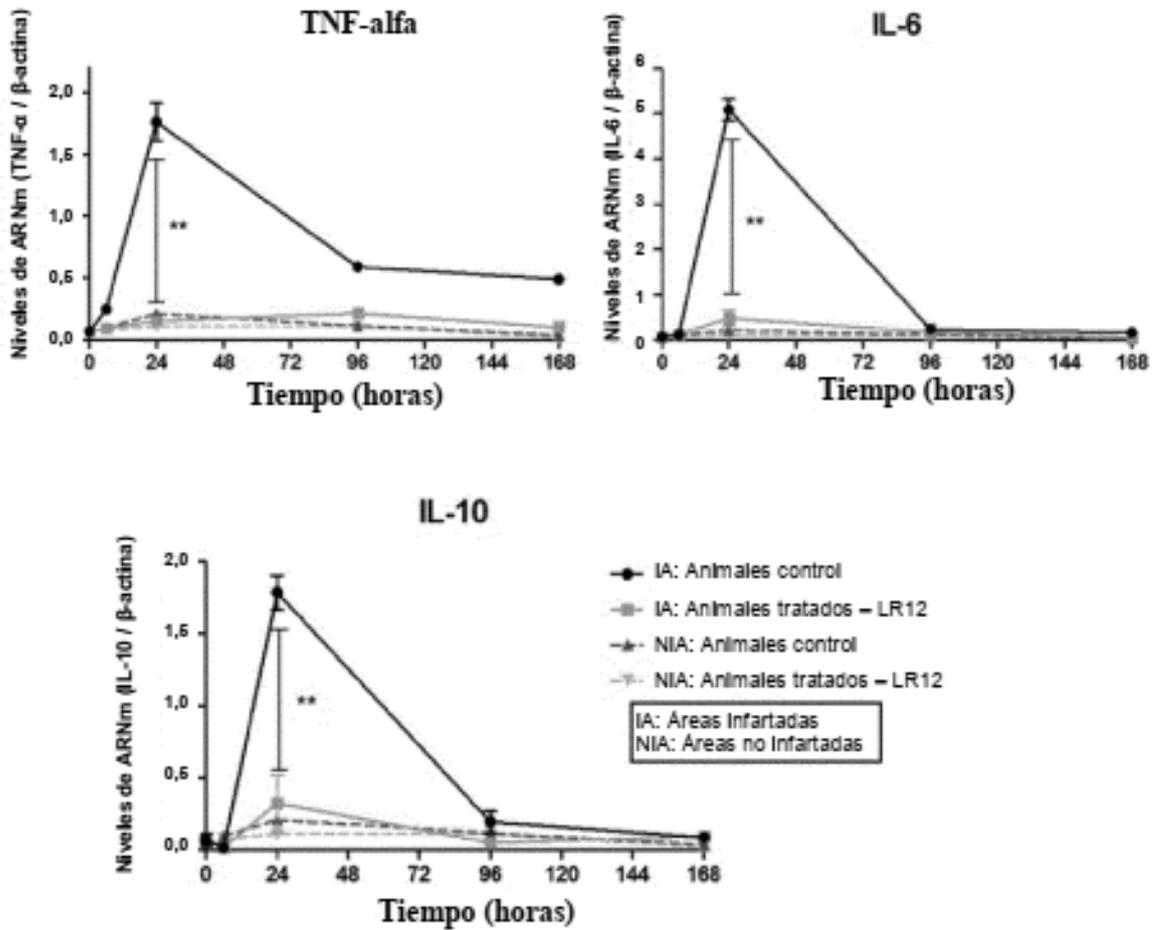


FIGURA 13

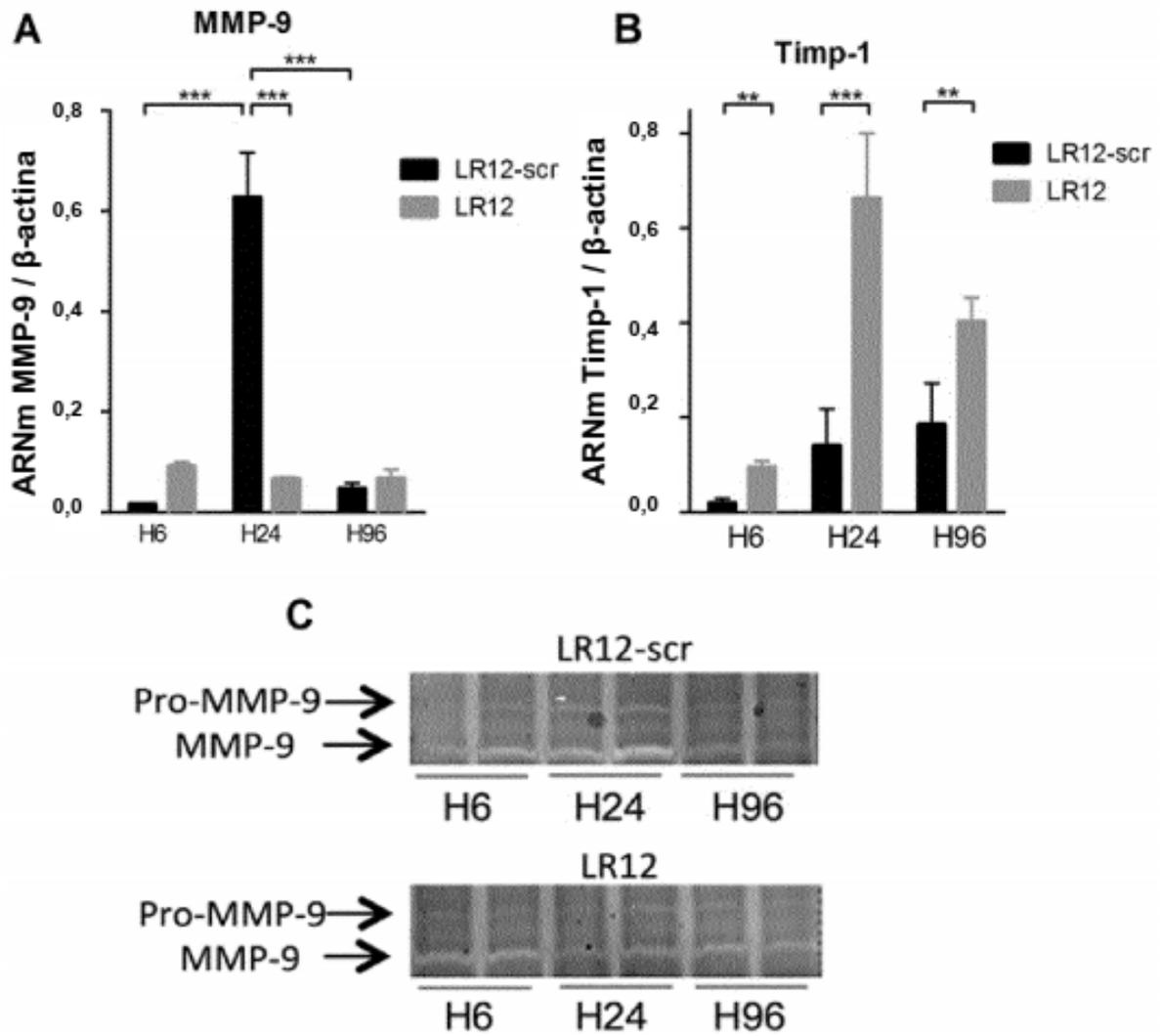


FIGURA 14

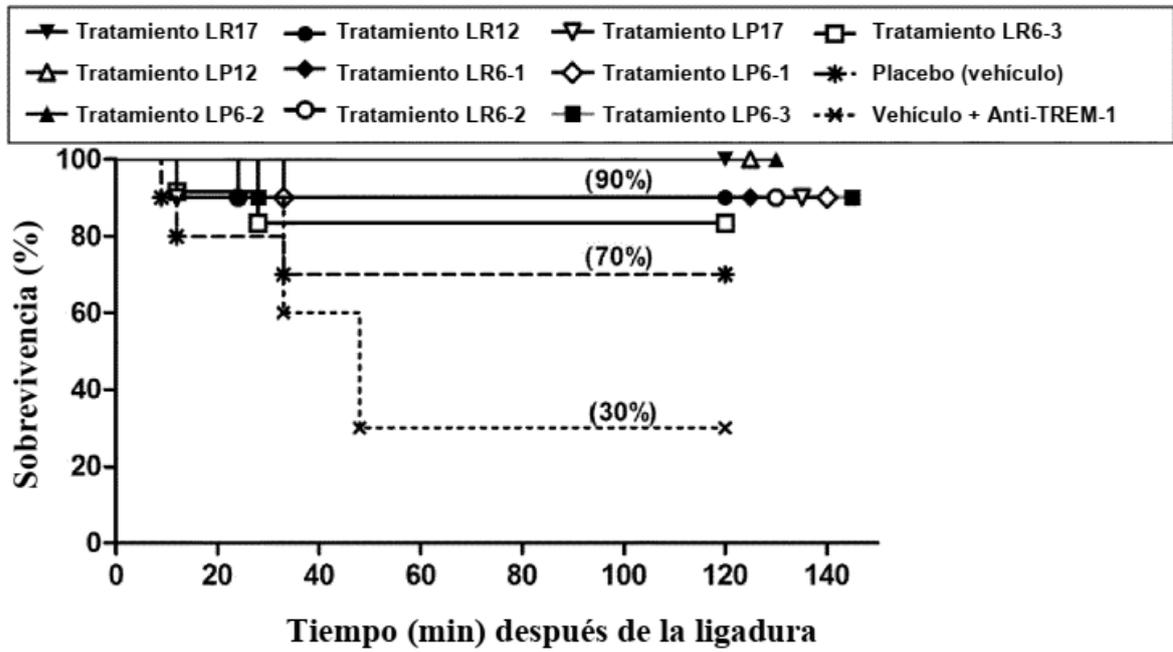


FIGURA 15

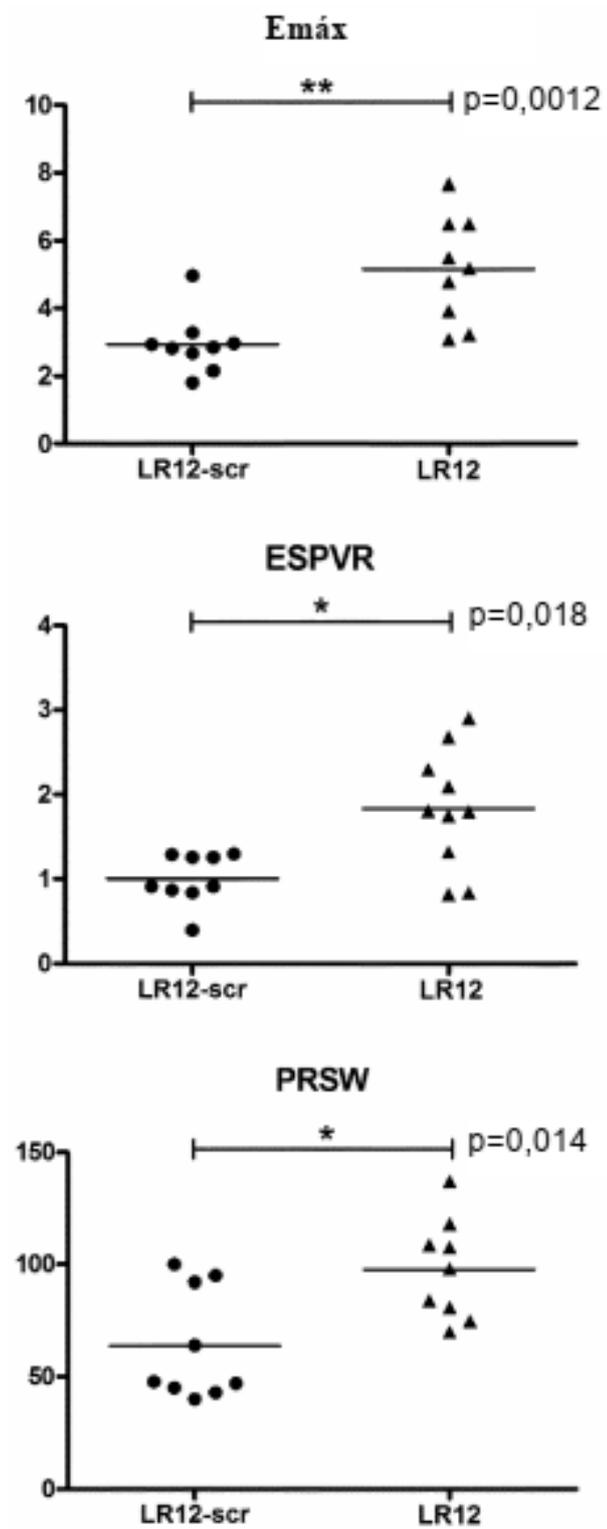


FIGURA 16

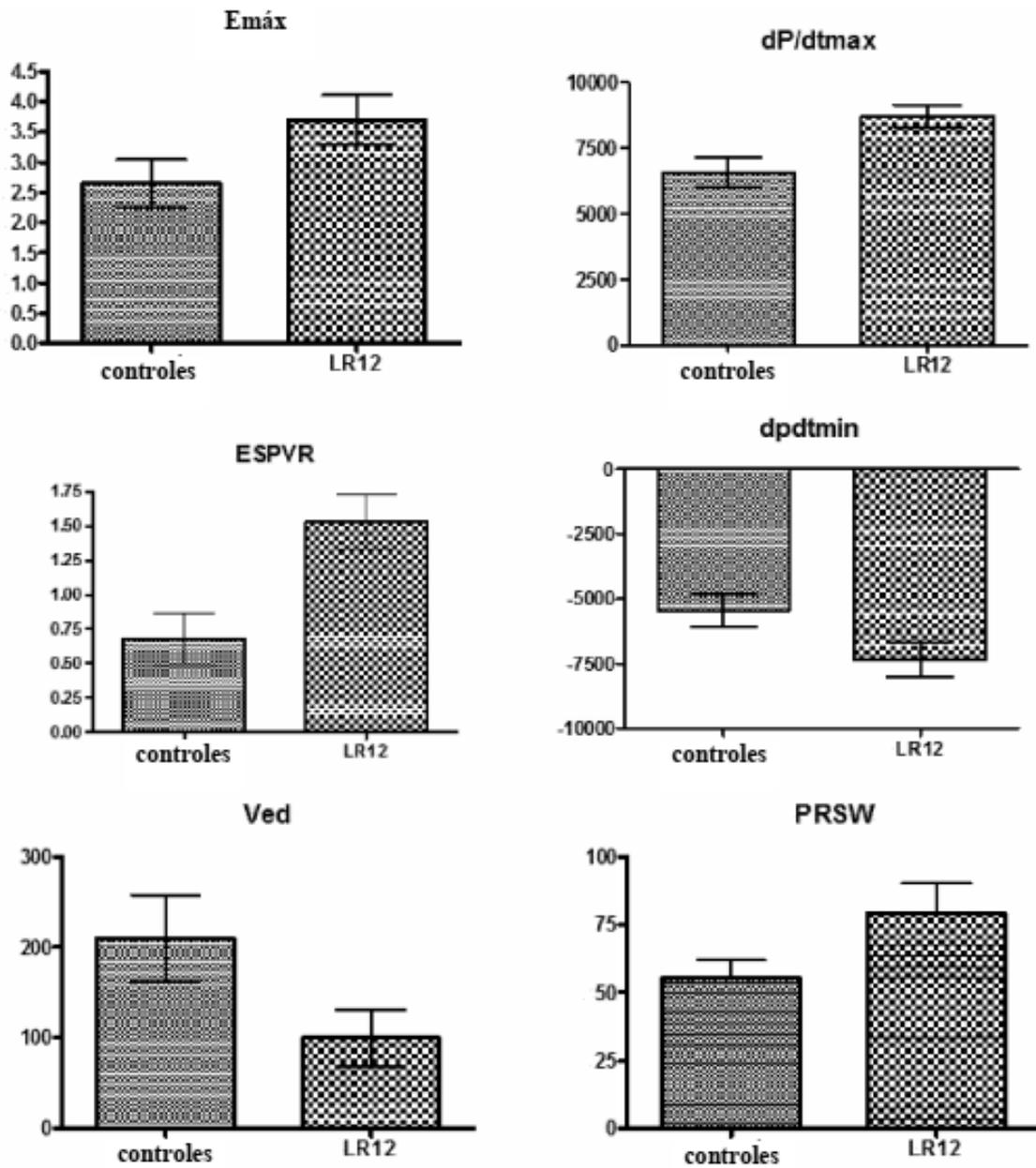
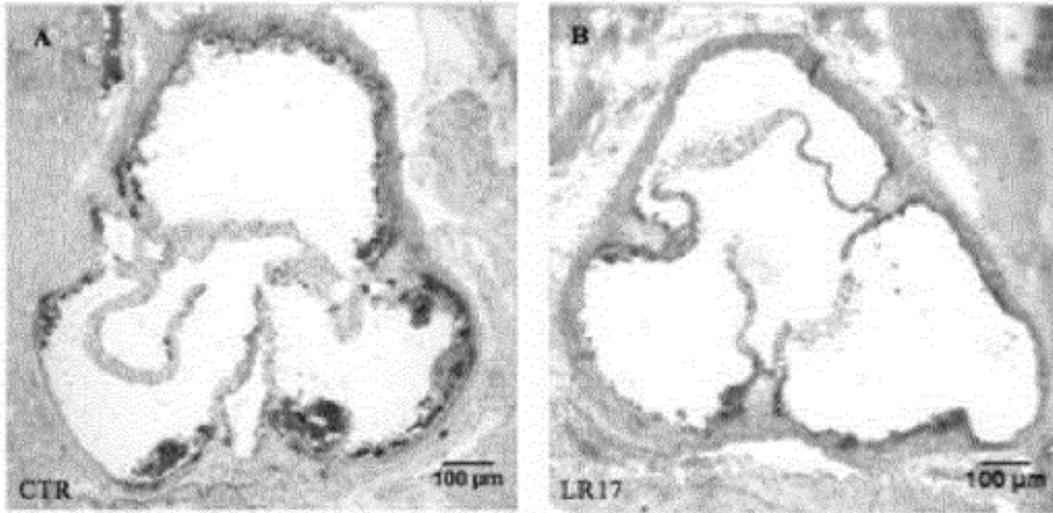


FIGURA 17



Tamaño de la placa (microm<sup>2</sup>)

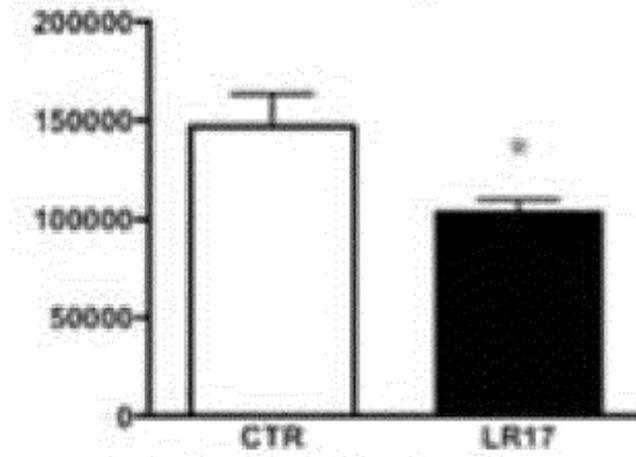
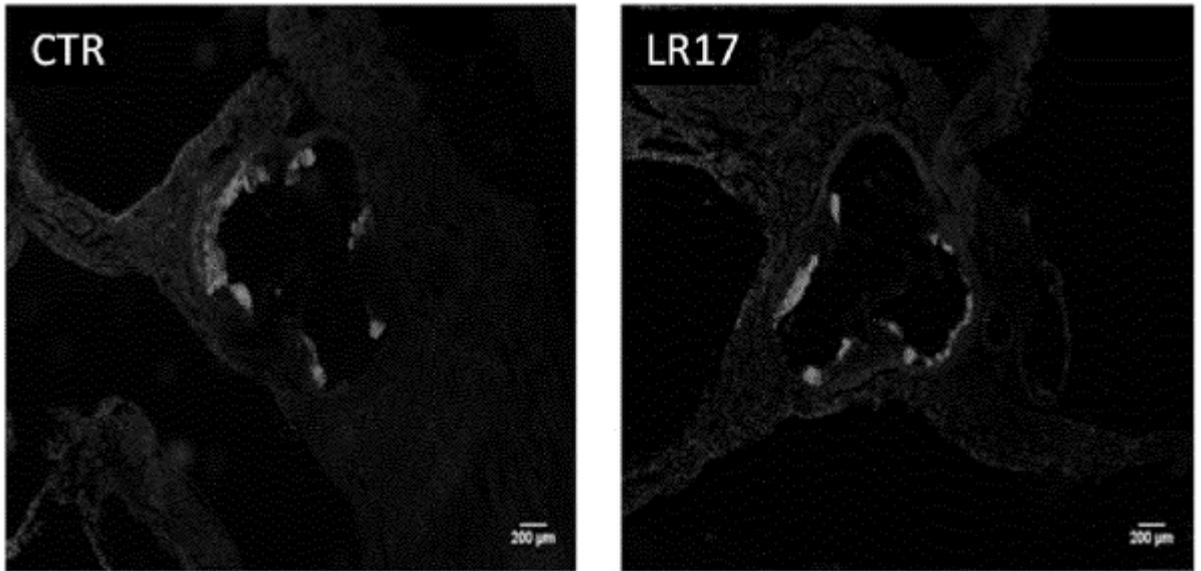


FIGURA 18



Área de macrófagos (microm<sup>2</sup>)

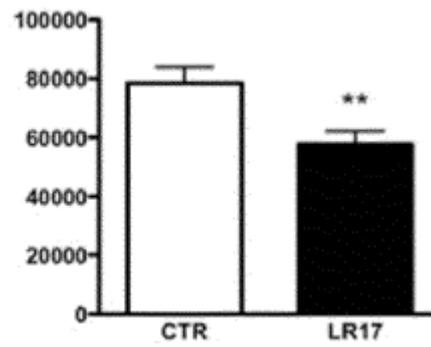


FIGURA 19

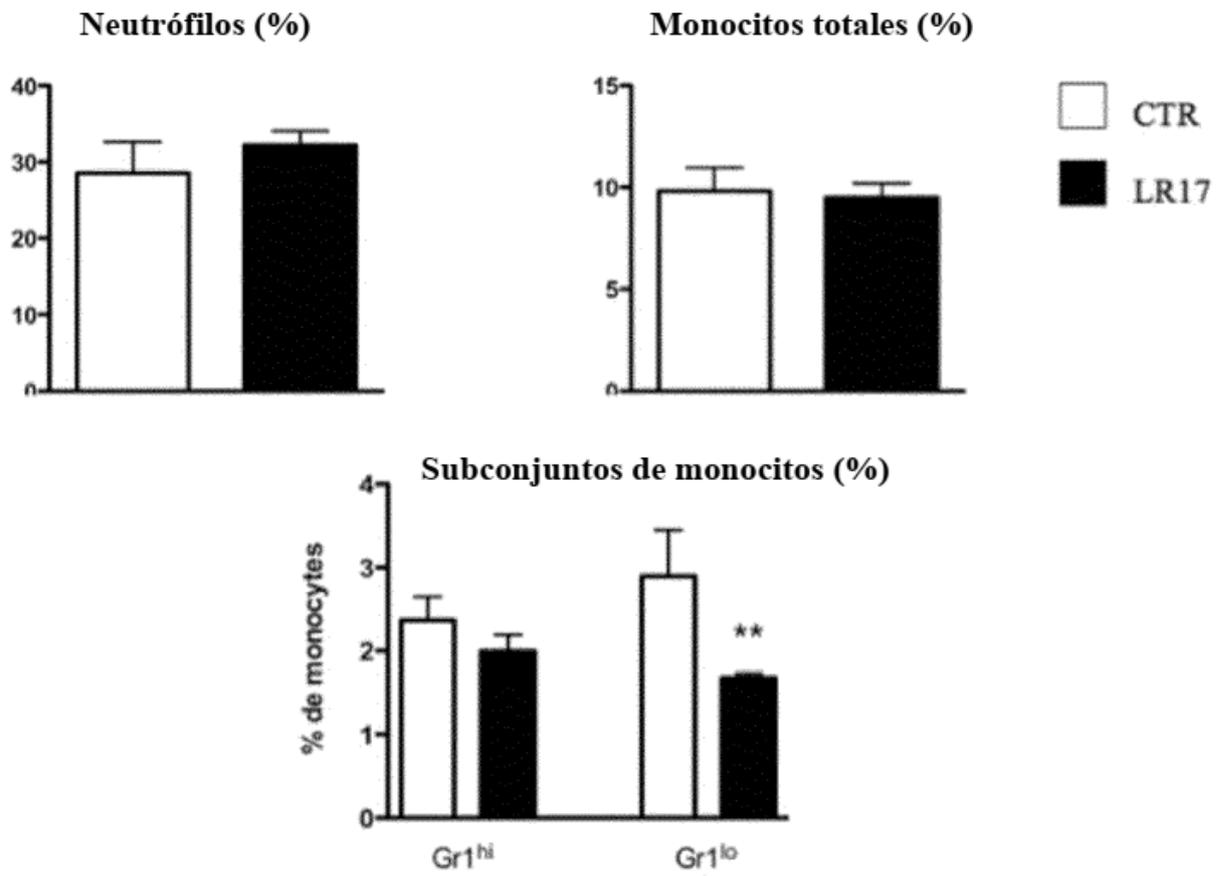


FIGURA 20

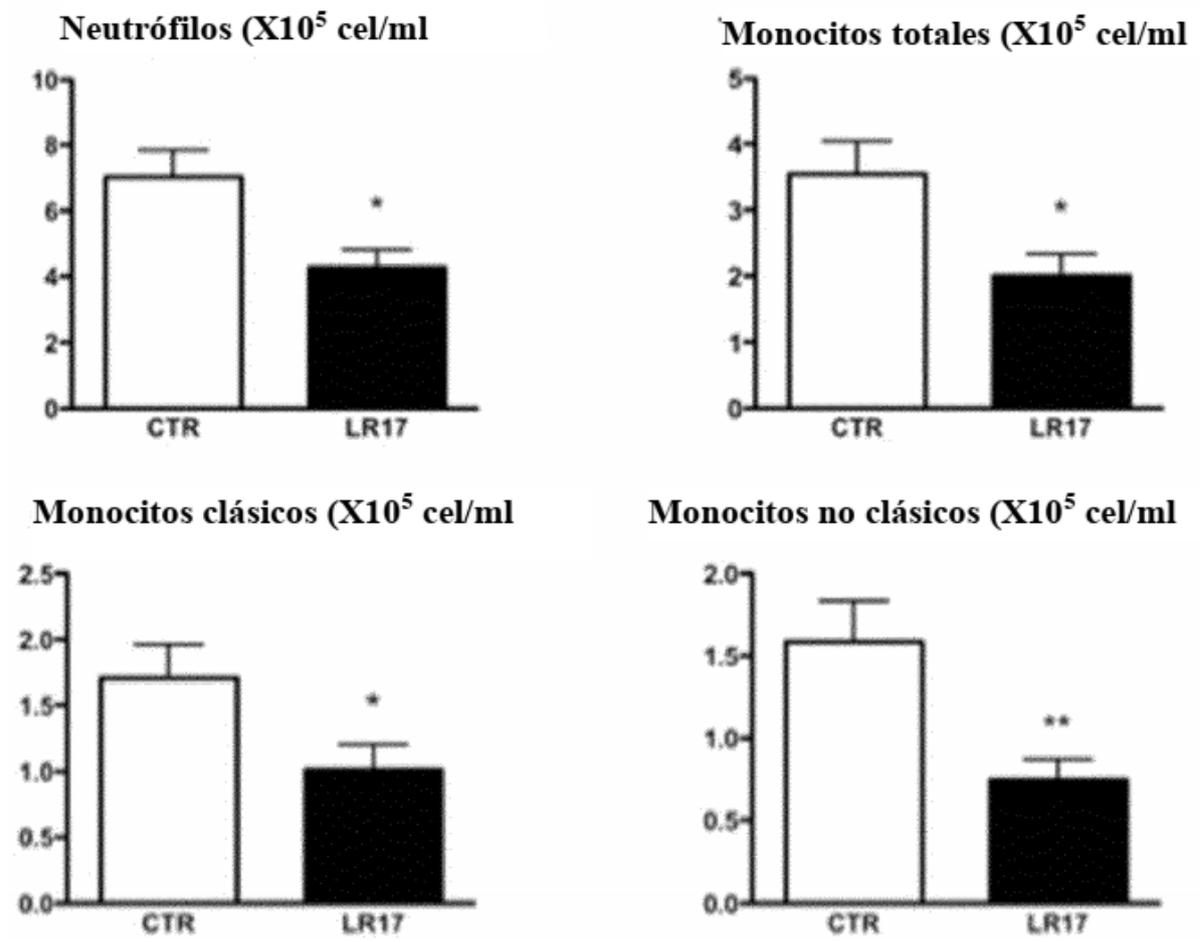


FIGURA 21

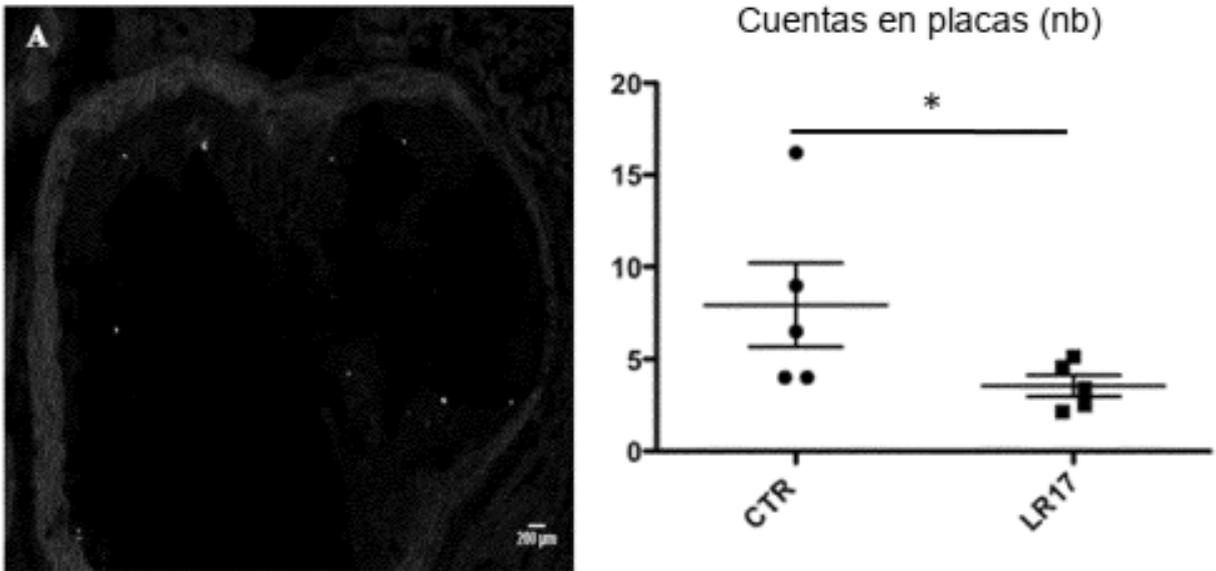


FIGURA 22