



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 331 970**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **06804388 .4**

⑨6 Fecha de presentación : **10.11.2006**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1962887**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2008**

⑤4 Título: **Procedimiento para determinar el efecto antiinflamatorio de un péptido.**

③0 Prioridad: **23.12.2005 AT A 2067/2005**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.01.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.01.2010

⑦3 Titular/es:
**Fibrex Medical Research & Development GmbH
Rabensteig 8/3A
1010 Wien, AT**

⑦2 Inventor/es: **Petzelbauer, Peter y
Henning, Rainer**

⑦4 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 331 970 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

Procedimiento para determinar el efecto antiinflamatorio de un péptido.

5 Antecedentes de la invención

La presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento del choque hemorrágico y sus fenómenos secundarios.

10 Un choque es una complicación aguda de muchos estados patológicos distintos que se caracteriza por la incapacidad del sistema cardiovascular de mantener una presión sanguínea suficiente. Mejor dicho, en el choque hemorrágico, la pérdida de sangre supera la capacidad del organismo para compensar y proporcionar una saturación de oxígeno y un riego sanguíneo de los tejidos suficientes. Esto se debe con frecuencia a un traumatismo, sin embargo puede provocarse también por una hemorragia espontánea (por ejemplo, hemorragia gastrointestinal, parto), una intervención quirúrgica y otros motivos.

Con la mayor frecuencia, un choque hemorrágico clínico se provoca por un acontecimiento hemorrágico agudo con un proceso desencadenante separado. Con menor frecuencia, se observa un choque hemorrágico en el caso de estados crónicos con pérdida de sangre subaguda. Este estado es la causa de muerte principal en el grupo de edades de 1-44.

Los mecanismos de compensación fisiológicos en el caso de una hemorragia comprenden una vasoconstricción mesentérica y periférica inicial, para desviar sangre hacia la circulación central. Esto se refuerza entonces mediante una taquicardia progresiva. Una monitorización invasiva puede revelar un índice cardíaco elevado, un aporte de oxígeno aumentado (es decir, DO_2) y un consumo de oxígeno elevado (es decir VO_2) por los tejidos. El nivel de lactato, el estado ácido-base y otras características pueden ser asimismo indicadores útiles para un estado fisiológico. La edad, los tratamientos medicamentosos así como los factores comórbidos pueden influir en la reacción de un paciente a un choque hemorrágico.

30 Un fallo de los mecanismos de compensación puede conducir a la muerte en el caso de un choque hemorrágico. Sin intervención, en el caso de un choque hemorrágico grave ha de considerarse una distribución trimodal clásica de las muertes. En el plazo de minutos tras una hemorragia aparece un pico de mortalidad inicial debido a un desangrado inmediato. Aparece otro pico debido a la descompensación progresiva después de de 1 a varias horas. Aparece un tercer pico después de días o semanas debido a una septicemia y a un fallo orgánico, que son un fenómeno secundario frecuente de un daño por reperfusión en los órganos.

El tratamiento de un choque provocado por una gran pérdida de sangre es un gran reto, dado que efectos secundarios, que van acompañados de una reacción inflamatoria y alteraciones del sistema de coagulación, posiblemente se volvieran independientes y conducen a la muerte del paciente, sin tener en cuenta la cuestión de si era posible una sustitución suficiente de fluido y sangre. Un tratamiento específico de una gran pérdida de sangre como consecuencia de accidentes u otras heridas y de un choque hemorrágico consiste en reanimación de fluidos con cristaloides o coloides para el restablecimiento del riego sanguíneo de los órganos. Además, los procedimientos actuales tienen como meta aliviar los síntomas, lo que incluye una ventilación mecánica, la sustitución de fluido, la aplicación de medicamentos eficaces para el corazón, el control riguroso de la saturación de oxígeno, de la hemoglobina, de la glucosa y de la función renal. El solo control de la reacción inflamatoria, por ejemplo por medio de una administración elevada de esteroides, o la inhibición de la coagulación con antitrombina, no proporciona ninguna mejora de la tasa de supervivencia.

Un choque como consecuencia de una pérdida de sangre y un choque hemorrágico están relacionados con alteraciones evidentes o no evidentes del fibrinógeno en plasma, acompañadas de una formación de fibrina y un aumento de los fragmentos de fibrina. Esta activación de la coagulación y las rutas fibrinolíticas puede conducir a una coagulación intravascular diseminada (DIC) evidente o no evidente, que tiene como consecuencia una obliteración vascular y daños orgánicos finales, y a un consumo de los factores de coagulación, que tiene como consecuencia hemorragias. Es importante que el fibrinógeno, la fibrina y los fragmentos de fibrina no desempeñan un papel sólo en la coagulación sanguínea, sino que presentan varios sitios de unión para proteínas celulares y de la matriz, que les permiten interactuar con glóbulos blancos, plaquetas, células endoteliales y estructuras de la matriz. Esto conduce a la activación celular, la migración celular, a una liberación de citocinas y finalmente a una reacción inflamatoria. El papel que desempeña el fibrinógeno o la fibrina en la inflamación está documentado por completo (comentado por Altieri *Thromb Haemost* 82:781-786; Herrick *et al.* *Int J Biochem Cell Biol* 31:741-46). La región D de la molécula contiene numerosos sitios de unión para moléculas de la matriz, células endoteliales, plaquetas y células inflamatorias. La región E de la fibrina se une a CD11c (Loike *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1044-48).

Hace poco se describió un nuevo papel para la secuencia Bbeta₁₅₋₄₂ de la fibrina en la inflamación (documento WO 02/48180). Esta secuencia está localizada asimismo en la región E de la fibrina y sólo es activa cuando se escinde el fibrinopéptido. Los fragmentos de fibrina que contienen esta secuencia en su extremo N-terminal libre de la cadena beta, se unen al endotelio y provocan una inflamación, y un péptido, que coincide con los aminoácidos 15-42 de la cadena Bbeta de la fibrina, bloquea la unión de fragmentos de fibrina a las superficies endoteliales y bloquea *in vitro* la

inflamación (documento WO 02/48180). *In vivo*, este péptido evita una inflamación miocárdica y reduce la magnitud de un infarto de miocardio en situaciones de isquemia/reperfusión (documento WO 02/48180).

En el documento WO2005/086578 se describe un procedimiento de medición para la determinación del efecto antiinflamatorio de péptidos, en el que se mide una inhibición de la función de las células T.

Los fragmentos de fibrina aparecen en cualquier situación con formación de fibrina afectada y fibrinólisis afectada. Especialmente, en situaciones de choque, esta formación de fibrina alterada y esta fibrinólisis alterada representan un gran problema. En el caso de numerosas enfermedades se documentó una correlación directa entre el resultado y la afectación de la formación de fibrina/fibrinólisis. Por ejemplo, Dengue (van Gorp *et al.* J Med Virol 2002, 67: 549-54, Mairuhu *et al.* Lancet Inf Dis 2003; 3:33-41). El síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS) es una forma de una afección pulmonar aguda, que se caracteriza por una deposición de fibrina completamente marcada extravascular (Idell Am J Respir Med. 2002; 1:383-91). Asimismo se observaron una trombosis en los vasos pulmonares y una coagulación intravascular diseminada en relación con el ARDS.

Sumario de la invención

La divulgación se refiere al uso de un péptido que comprende la secuencia N-terminal

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg

o cualquier variante alélica o derivado de este péptido, que presenta la propiedad biológica de coincidir con el motivo de unión a cadherina VE inducible en la cadena B β (es decir, B β ₁₅₋₄₂) de la fibrina humana, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del choque.

En una forma de realización preferida este péptido es

Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Lys-Arg-Glu-Glu-Ala-Pro-Ser-Leu-Arg-Pro-Ala-Pro-Pro-Ile-Ser-Gly-Gly-Gly-Tyr-Arg.

Sorprendentemente se comprobó que estos péptidos, en el caso de la protección de animales de sangre caliente frente a las consecuencias y complicaciones de una reperfusión tras mayores acontecimientos de hemorragia y de un choque hemorrágico, presentan un efecto excepcionalmente favorable. Pudo mostrarse que pueden evitar los daños orgánicos y el fallo orgánico que se deben a reacciones inflamatorias agudas provocadas por choque hemorrágico y reperfusión. Los péptidos pueden evitar enfermedades tales como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), insuficiencia renal, insuficiencia hepática y fallo multiorgánico.

Descripción detallada de la invención

Péptidos y proteínas

Se prepararon péptidos mediante una síntesis de péptidos en fase sólida y se purificaron por medio de una HPLC en fase inversa, usándose columnas Nucleosil 100-10 C18 (PiChem, Graz, Austria). Debería observarse que la región beta 15-42 es similar al 100% entre especies, cuando se permiten sustituciones de aminoácidos conservativas. El nudo de disulfuro N-terminal compuesto por los aminoácidos A α 1-51, B β 1-118 y γ 1-78 del fibrinógeno (NDSK) se preparó tal como se describió anteriormente (documento WO 02/48180). El nudo de disulfuro N-terminal compuesto por los aminoácidos A α 17-51, B β 15-118 y γ 1-78 de la fibrina (NDSK-II, al que le faltan los fibrinopéptidos A y B) se preparó tratando NDSK a 37°C durante 3 horas con trombina (20 U / 1 mg de NDSK). La trombina restante se neutralizó a 37°C durante 2 horas con fluorofosfato de diisopropilo 10 mM (Fluka, Milwaukee, WI). Todos los productos se dializaron a continuación en una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

ELISA

El péptido B β ₁₅₋₄₂ se une a cadherina VE

La interacción de la cadena Bbeta (Bbeta₁₅₋₄₂) de la fibrina con células endoteliales provoca alteraciones morfológicas (Bunce *et al.* J Clin Invest 89:842-50; Bach *et al.* Exp Cell Res 238:324-34; Chalupowicz *et al.* J Cell Biol 130:207-15; Hamaguchi *et al.* Blood 81:2348-56; Francis *et al.* Blood cells 19:291-306), una proliferación (Sporn *et al.* Blood 86:1802-10), la liberación del factor de von Willebrand (Ribes *et al.* J Clin Invest 79:117-23, Ribes *et al.* J Clin Invest 84: 435-42; Erban y Wagner, J Biol Chem 267, 2451-58) y posiblemente IL-8 (Qi *et al.* Blood 90: 3593-3602) y una expresión en la membrana de CD54 (Harley *et al.* Art Thromb Vasc Biol 20:652-658). Se identificó la cadherina VE como ligando de unión de la secuencia Bbeta₁₅₋₄₂ y se desarrollaron ensayos ELISA para determinar esta interacción de las células endoteliales y/o la cadherina VE con la fibrina o los fragmentos de fibrina. Martinez *et al.* usaron anticuerpos anti-pan-cadherina para atrapar cadherinas de células endoteliales, seguido de una incubación

con fibrina (Martinez *et al.* Ann NY Acad Sci 936:386-405), se recubrieron monocapas de HUVEC (que expresan cadherina VE) con fragmentos de fibrina radiomarcados o péptido B β ₁₅₋₄₂ (Bach *et al.* J Biol Chem 273:30719-28; Harley *et al.* Art Thromb Vasc Biol 20:652-658), y se usó cadherina VE recombinante de Gorlatov y Medved (Biochemistry 41:4107-16). Otros utilizaron un ELISA para la detección de fragmentos de fibrina en la sangre, usando principalmente anticuerpos frente a distintas secuencias dentro de la molécula de fibrinógeno, incluidos anticuerpos frente al motivo B β ₁₅₋₄₂ (comentado en Fareed *et al.* Clin Chem 8:1845-53).

Se desarrolló un ELISA modificado, que trabajaba con los mismos principios descritos por otros, sin embargo, el objetivo del ELISA descrito en este caso no consiste en determinar cuantitativamente los productos de la degradación de la fibrina, sino buscar proteínas, péptidos o compuestos que alteren la unión de la secuencia B β ₁₅₋₄₂ y de la cadherina VE. El principio consiste en que la cadherina VE puede interaccionar o bien como proteína acortada, o bien como proteína completa o bien acoplada con otras proteínas, que no alteran el sitio de unión de B β ₁₅₋₄₂, con la secuencia B β ₁₅₋₄₂ de la fibrina. Puede agregarse cualquier otra sustancia adicional a este sistema y medirse si la sustancia inhibe la unión de cadherina VE/B β ₁₅₋₄₂.

En detalle, se recubrieron placas de inmovilización de proteínas de 96 pocillos (Exiqon, Vedbaek, DK) con proteína de fusión cadherina VE-FC humana recombinante (8 nM/ml; R&D Systems, Minneapolis) en PBS y se dejó reposar durante la noche a 4°C. Después se lavaron las placas y se incubaron con péptido B β ₁₅₋₄₂ (GHRPLDKK REEAPSLRPAPPPISGGGYR), que estaba marcado en el extremo C-terminal del péptido con una secuencia FLAG (DYKDDDDK), o con un péptido al azar marcado con FLAG (DRGAPAHRRPPRGPIGRSTPEKEKLLPG) y, concretamente, en una concentración de 0-80 μ moles/ml. Tras el lavado se detectó mediante incubación con un anticuerpo anti-FLAG marcado con peroxidasa (Sigma, St. Louis, EE.UU.) y un sustrato cromógeno el péptido marcado con FLAG unido. La densidad óptica se determinó mediante un lector de placas para ELISA ajustado a una longitud de onda de 450 nm. Los datos representan el valor medio de tres ensayos independientes, realizándose cada uno por triplicado. La tabla a continuación muestra que el péptido B β ₁₅₋₄₂ se unía a la cadherina VE de manera dependiente de la concentración. En contraposición con esto, el péptido al azar mostró sólo una unión insignificante.

Unión dependiente de la dosis del péptido B β ₁₅₋₄₂ a cadherina VE

μ M/ml		0	0,23	0,7	2,3	7	14	21	35	46	70
Péptido 15-42	Valor medio	0	0,01	0,02	0,08	0,33	0,92	1,3	1,5	1,93	2,1
FLAG	Desviación estándar	0	0,01	0,01	0,03	0,17	0,19	0,2	0	0	0
Péptido al azar	Valor medio	0	0,01	0	0,01	0,03	0,12	0,2		0,35	0,5
FLAG	Desviación estándar	0	0,01	0	0,01	0,02	0,04	0,1		0	0

El péptido B β ₁₅₋₄₂ y los fragmentos de fibrina compiten con respecto a la unión a cadherina VE.

En una etapa siguiente se analiza si este ELISA puede usarse para examinar otros péptidos/compuestos, que compiten por la unión de la secuencia B β ₁₅₋₄₂ a cadherina VE. Según lo esperado, el péptido B β ₁₅₋₄₂ inhibía completamente la unión del péptido B β ₁₅₋₄₂ marcado con flag y se usó como control positivo, y el péptido al azar o el disolvente no tenían ningún efecto y se usaron como controles negativos. Péptidos más cortos inhibían parcialmente la unión de B β ₁₅₋₄₂ a cadherina VE. NDSK-II inhibía la unión de B β ₁₅₋₄₂ de manera dependiente de la concentración. Se consiguió un equilibrio entre B β ₁₅₋₄₂ y NDSK-II (inhibición del 50%) en el caso de una razón en moles de 24:1. NDSK tenía poco o nada de efecto.

Se recubrió la superficie de plástico con cadherina VE en una concentración de 8 nM/ml. Después se añadieron los péptidos indicados en concentraciones de 200 μ M/ml, se añadió NDSK o NDSK-II en las concentraciones indicadas. La detección de la unión de B β ₁₅₋₄₂ marcado con FLAG (12 μ M/ml) se realizó tal como se describió anteriormente.

ES 2 331 970 T3

Además se identificó un análisis específico para determinar la actividad afirmada de los péptidos, que consiste en una medición de la inhibición de la liberación de interleucina-6 a partir de células endoteliales. La interleucina-6 resultó ser un fuerte agente para la predicción del desenlace y de la mortalidad en la situación de un choque y por tanto es un parámetro valioso para la determinación de los efectos favorables de los péptidos.

Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento para determinar el efecto antiinflamatorio de un péptido mediante la medición de la inhibición de la liberación de interleucina-6 (IL-6) a partir de células endoteliales tras una exposición al fragmento E de la fibrina.

Reactivo de bloqueo	% de inhibición de la unión de 15-42FLAG a cadherina VE
	Valor medio \pm desviación estándar
Péptido 15-42 (28-mero)	100 \pm 10
Péptido al azar (4-mero)	3 \pm 3
Péptido al azar (28-mero)	10 \pm 3
Disolvente	0 \pm 0
Péptido 15-18 (4-mero) 200 μ M/ml	65 \pm 12
Péptido 15-26 (12-mero) 200 μ M/ml	64 \pm 10
Péptido 15-30 (16-mero) 200 μ M/ml	61 \pm 13
Péptido 15-34 (20-mero) 200 μ M/ml	67 \pm 17
Péptido 15-37 (24-mero) 200 μ M/ml	17 \pm 19
Péptido 16-42 (27-mero) 200 μ M/ml	55 \pm 13
Péptido 15-18 (4-mero) 12 μ M/ml	7 \pm 2
Péptido 15-26 (12-mero) 12 μ M/ml	6 \pm 1
Péptido 15-30 (16-mero) 12 μ M/ml	6 \pm 3
Péptido 15-34 (20-mero) 12 μ M/ml	7 \pm 1
Péptido 15-37 (24-mero) 12 μ M/ml	7 \pm 2
Péptido 16-42 (27-mero) 12 μ M/ml	5 \pm 2

ES 2 331 970 T3

5	NDSK-II 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$	1 + 0
	NDSK-II 0,12 $\mu\text{M}/\text{ml}$	39 + 18
	NDSK-II 0,20 $\mu\text{M}/\text{ml}$	42 + 14
10	NDSK-II 0,60 $\mu\text{M}/\text{ml}$	52 + 16
	NDSK-II 1,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$	63 + 13
15	NDSK-II 2,4 $\mu\text{M}/\text{ml}$	79 + 9
	NDSK-II 4,0 $\mu\text{M}/\text{ml}$	82 + 12
20	NDSK 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$	0 + 0
	NDSK 0,12 $\mu\text{M}/\text{ml}$	2 + 1
	NDSK 0,20 $\mu\text{M}/\text{ml}$	1 + 1
25	NDSK 0,60 $\mu\text{M}/\text{ml}$	7 + 6
	NDSK 1,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$	15 + 13
30	NDSK 2,4 $\mu\text{M}/\text{ml}$	16 + 9
	NDSK 4,0 $\mu\text{M}/\text{ml}$	20 + 10
35	Ac anti-cadherina VE (TEA1/31, 1 mg/ml)	2 + 1

40 *Inhibición de la liberación de interleucina-6 a partir de células endoteliales*

Se recubrieron placas de cultivo celular de 96 pocillos con gelatina al 1%. En cada pocillo se pipetearon aproximadamente 23.000 células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVEC) en 200 μl de medio. Las HUVEC se tomaron del pase 4 de un conjunto de cuatro donadores distintos. El medio usado para la dilución fue un medio convencional con FCS al 10%, ECGS en medio Dulbecco modificado por Iscove (*Iscove's modified Dulbecco medium*) (Petzelbauer *et al.*, J Immunol. 151: 5062-5072, 1993). En el plazo de aproximadamente 18 horas se formó a 37°C en una incubadora una monocapa de células confluyente. Se eliminó el sobrenadante y se sustituyó por un medio que contenía o bien NDSK-II solo o bien NDSK-II más péptido B β ₁₅₋₄₂ (GHRPLDKKKREEAPSLRPAPPISGGGYR).

El volumen total definitivo ascendió a 200 μl . Tras una incubación de 4 horas a 37°C bajo CO₂ al 5% se eliminó de nuevo el sobrenadante del cultivo celular y se centrifugó durante 10 minutos a 4°C con 3000 U/min. La concentración de interleucina-6 (IL-6) se midió con la aplicación de un análisis habitual en el comercio (IL-6 Quantikine Immunoassay (R&D Systems; n.º de catálogo: D6050; lote: 231361). La calibración se realizó según el protocolo convencional proporcionado por el fabricante del análisis con diferentes diluciones de IL-6 recombinante y medio. Las lecturas de la densidad óptica tuvieron lugar a una longitud de onda de 450 nm con una longitud de onda de referencia de 550 nm.

ES 2 331 970 T3

Resultados

		Concentración de IL-6 en pg/ml
5	Medio	12±1
	NDSK-II 0,3 µg/ml	19±2
10	NDSK-II 0,3 µg/ml + péptido 10 µg/ml	15±2
	NDSK-II 3 µg/ml	25±3
15	NDSK-II 3 µg/ml + péptido 10 µg/ml	12±3 (p<0,05 en comparación con NDSK-II solo)
20	NDSK-II 30 µg/ml	21±2
	NDSK-II 30 µg/ml + péptido 10 µg/ml	13±1 (p<0,05 en comparación con NDSK-II solo)
25		
30		

Choque hemorrágico en cerdos domésticos

Se alimentaron cerdos domésticos Landrace macho con un peso de 20-35 kg con alimento convencional y recibieron agua a voluntad. Todos los procesos se realizaron de acuerdo con las directrices de la AAALAC y según el *Handbuch für die Pflege von Labortieren* (Manual para el mantenimiento de animales de laboratorio) (Departamento de salud y asuntos sociales, Instituto nacional de la salud, publicación n.º 86-23). Se trataron previamente de manera medicamentosa los cerdos con azaperona (4 mg/kg). Se introdujo una cánula en la vena de la oreja, y se administró el anestésico propofol. Se instrumentaron completamente los animales durante 1 hora y se equilibraron para obtener una línea de base estable. A continuación se extrajo sangre de los animales (n=16), hasta que se consiguió una tensión arterial media de 40 mm Hg. Se mantuvieron durante 1 hora a ese nivel, que representaba un choque hemorrágico. Tras este periodo de tiempo se substituyó el volumen de la sangre perdida por la sangre derramada y soluciones salinas (cristaloides). Además, los animales recibieron una dosificación en bolo del péptido Bβ15-42 (n=8) o un péptido con secuencia al azar (n=8) en una dosificación de 2,4 mg/kg, y, concretamente, en cada caso como inyección en bolo intravenosa individual. Durante el periodo de reperfusión posterior de 5 horas de duración se determinaron el índice de Horowitz (medición de la saturación de oxígeno de la sangre), la PEEP (presión espiratoria final positiva en mm Hg) y el volumen de gasto cardiaco en distintos tiempos. En las tablas siguientes se usaron los siguientes tiempos:

50	Tiempo 1:	1 hora antes del choque hemorrágico
	Tiempo 2:	durante el choque hemorrágico
	Tiempo 3:	1 hora tras el inicio de la reperfusión
55	Tiempo 4:	3 horas tras el inicio de la reperfusión
	Tiempo 5:	5 horas tras el inicio de la reperfusión.

60

65

ES 2 331 970 T3

EV (ml)

		Grupo control	Grupo tratado	
5	1:	38 +/- 1	44 +/- 2	
	2:	6 +/- 1	6 +/- 1	
	3:	25 +/- 3	31 +/- 4	p<0,05
10	4:	25 +/- 4	32 +/- 3	p<0,05
	5:	22 +/- 2	37 +/- 4	p<0,05

15

Índice de Horowitz

		Grupo control	Grupo tratado	
20	1:	460 +/- 20	465 +/- 20	
	2:	395 +/- 60	450 +/- 20	
25	3:	425 +/- 30	420 +/- 10	
	4:	360 +/- 50	410 +/- 20	
30	5:	220 +/- 20	420 +/- 30	p<0,05

PEEP (mm Hg)

		Grupo control	Grupo tratado	
35	1:	4 +/- 0,2	4 +/- 0,1	
	2:	4,3 +/- 0,3	4 +/- 0,1	
40	3:	5 +/- 0,3	4,1 +/- 0,2	p<0,05
	4:	5,4 +/- 0,4	4,2 +/- 0,3	p<0,05
45	5:	6,6 +/- 0,4	4,3 +/- 0,2	p<0,05

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar los efectos antiinflamatorios de un péptido mediante la medición de la inhibición
5 de la liberación de interleucina-6 (IL-6) a partir de células endoteliales tras una exposición al fragmento E de la fibrina.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65