

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 447**

51 Int. Cl.:

A61K 38/02 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2006 E 06784792 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1904084**

54 Título: **Métodos para proteger frente a apoptosis usando lipopéptidos**

30 Prioridad:

13.06.2005 US 689810 P

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

02.09.2013

73 Titular/es:

CLEVELAND BIOLABS, INC. (50.0%)
11000 Cedar Avenue
Cleveland, Ohio 44106 , US y
CLEVELAND CLINIC FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:

SHAKHOV, ALEXANDER, N. y
GUDKOV, ANDREI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 421 447 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

Métodos para proteger frente a apoptosis usando lipopéptidos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere al uso de inductores de NF-κB para proteger a mamíferos de los efectos de la apoptosis. Más específicamente, esta invención se refiere al uso de inductores de NF-κB para proteger a mamíferos de la exposición al estrés, tal como radiación y tratamientos del cáncer.

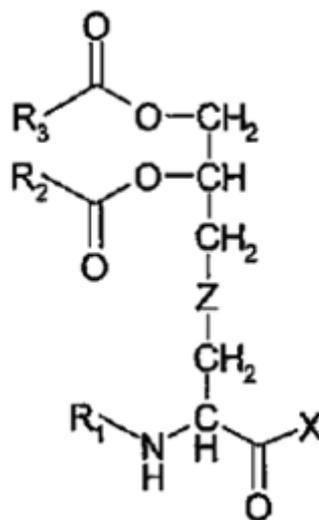
Antecedentes de la invención

10 La progresión de células normales a células tumorales implica una pérdida de los mecanismos negativos de regulación del crecimiento, incluyendo resistencia a estímulos inhibidores del crecimiento y una ausencia de dependencia de factores de crecimiento y hormonas. Los tratamientos tradicionales del cáncer que están basados en radiación o fármacos citotóxicos se basan en las diferencias en el control del crecimiento de las células normales y malignas. Los tratamientos tradicionales del cáncer someten a las células a un estrés genotóxico severo. En estas condiciones, la mayoría de las células normales se paran y por lo tanto se salvan, mientras que las células tumorales continúan dividiéndose y mueren.

15 Sin embargo, la naturaleza de las estrategias convencionales del tratamiento del cáncer es tal que los tejidos normales que se dividen rápidamente o tendentes a la apoptosis están en peligro. El daño a estas células normales que se dividen rápidamente causa los efectos secundarios bien conocidos del tratamiento del cáncer (tejidos sensibles: hematopoyesis, intestino delgado, folículos pilosos). La sensibilidad natural de dichos tejidos se complica por el hecho de que las células cancerosas adquieren frecuentemente defectos en la maquinaria del suicidio (apoptótica) y los procedimientos terapéuticos que causan la muerte en los tejidos sensibles normales pueden no ser eficaces en las células cancerosas. Los intentos convencionales para minimizar los efectos secundarios de las terapias del cáncer se basan en (a) hacer que las células tumorales sean más susceptibles al tratamiento, (b) hacer que las terapias del cáncer sean más específicas para las células tumorales, o (c) estimular la regeneración del tejido normal después del tratamiento (por ejemplo, eritropoyetina, GM-CSF, y KGF). Cada uno de éstos, sin embargo, tiene una eficacia limitada. Como resultado, continúa existiendo una necesidad de agentes terapéuticos para mitigar los efectos secundarios asociados con la quimioterapia y la terapia con radiación en el tratamiento del cáncer. Esta invención satisface estas necesidades y proporciona otras ventajas relacionadas.

Resumen de la invención

30 En la presente memoria se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula:



en la que,

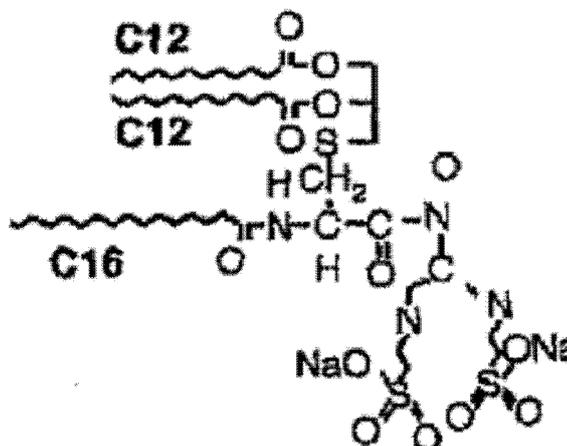
R₁ representa H o -CO-R₄,

R₂, R₃ y R₄ son independientemente H o alifático C₆-C₂₀ sustituido opcionalmente;

x es un péptido que comprende SEQ ID NO: 21 y

Z es S o CH₂.

El compuesto puede ser un estereoisómero RR o RS, o mezcla de éstos. El compuesto también puede ser de la fórmula:



5

La composición de la presente invención puede usarse en un método para proteger a un mamífero de los efectos de uno o más tratamientos o afección que desencadena apoptosis.

La afección que desencadena la apoptosis puede ser radiación, lesión, envenenamiento, infección o choque térmico. El tratamiento que desencadena la apoptosis puede ser un tratamiento del cáncer. El tratamiento del cáncer puede ser quimioterapia o terapia con radiación. El tejido en el que la apoptosis se desencadena puede ser el bazo, timo, tracto GI, pulmones, riñones, hígado, sistema cardiovascular, endotelio de los vasos sanguíneos, sistema nervioso (central o periférico), células progenitoras hematopoyéticas (médula ósea), sistema inmune, folículos pilosos o el sistema reproductor.

El compuesto puede administrarse en combinación con un radioprotector. El radioprotector puede ser un antioxidante, tal como amifostina o vitamina E. El radioprotector también puede ser una citoquina, tal como factor de células madre. El radioprotector también puede ser flagelina, TGFβ latente o un activador de un TLR.

Descripción breve de las figuras

La Fig. 1 ilustra que la deficiencia de p53 aceleraba el desarrollo del síndrome gastrointestinal inducido por la radiación en ratones. El Panel A presenta gráficos del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 9, 12,5, 25 ó 5 x 2,5 Gy de radiación gamma de cuerpo entero después de pretratamiento con un inhibidor de p53, pifitrina-alfa (PFT), o DMSO (control). También se expusieron ratones nulos para p53 a la dosis de radiación acumulativa fraccionada de 12,5 Gy (5 x 2,5 Gy). El Panel B presenta gráficos del porcentaje de supervivencia de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 después de exposición a dosis bajas (10 Gy) o altas (15 Gy) de radiación gamma de cuerpo entero. El Panel C presenta un gráfico que ilustra el porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 15 Gy de radiación gamma de cuerpo entero después de reconstitución con médula ósea (BM) de ratones de tipo salvaje o nulos para p53. El Panel D presenta secciones intestinales de parafina teñidas con hematoxilina-eosina de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 en los puntos de tiempo indicados después de 15 Gy de radiación gamma. Los recuadros a las 24h muestran tinción TUNEL de regiones de las criptas.

La Fig. 2 ilustra las dinámicas de la proliferación y supervivencia celulares en los intestinos delgados de ratones de tipo salvaje y nulos para p53. El Panel A (izquierda) muestra autorradiografías de secciones de cuerpo completo de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 a los que se inyectó ¹⁴C-timidina que se trataron con 15 Gy de radiación gamma o no se trataron. Las flechas apuntan a los intestinos. El Panel A (derecha) muestra fotomicrografías de la incorporación de BrdU en el intestino delgado de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 a diferentes puntos de tiempo después de 15 Gy de radiación gamma. Las regiones de las imágenes a las 96h se muestran con un aumento mayor. El Panel B presenta un gráfico del número de células/cripta positivas para BrdU en el intestino delgado de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 a diferentes puntos de tiempo después de 15 Gy de radiación gamma. El Panel C presenta fotomicrografías de células marcadas con BrdU en el intestino delgado de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 a diferentes puntos de

tiempo después de 15 Gy de radiación gamma. El BrdU se inyectó 30 min antes de la irradiación y los ratones se sacrificaron a los puntos de tiempo indicados.

5 La Fig. 3 ilustra el efecto radioprotector del compuesto, CBLB601. Se muestran gráficos del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 9, 12,5, 25 ó 5 x 2,5 Gy de radiación gamma de cuerpo entero después de pretratamiento con CBLB601 o PBS.

La Fig. 4 ilustra alteraciones en el tamaño del bazo después de exposición a 13 Gy de irradiación gamma de cuerpo entero después de pretratamiento con CBLB601 o PBS. A la izquierda hay un gráfico de pesos de bazos de ratones tratados con PBS y CBLB601, y a la derecha hay imágenes de bazos de los ratones control o tratados.

10 La Fig. 5 ilustra la determinación del tiempo óptimo para la inyección intraperitoneal de CBLB601. El Panel A muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de irradiación de cuerpo entero (TBI) después de la administración intraperitoneal de PBS o CBLB601 24, 6, 1 ó 0,5 h antes de la irradiación. El Panel B muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal de PBS o CBLB601 96, 72, 48, 24 ó 1 h antes de la irradiación.

15 La Fig. 6 ilustra la determinación de la dosis óptima de CBLB601. El Panel A muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal de PBS ó 1, 3, 10, 20, 30 μ g de CBLB601/ratón 24 h antes de la irradiación. El Panel B muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal de PBS ó 0,1, 0,3, 1, 3, 10 ó 15 μ g de CBLB601/ratón 24 h antes de la irradiación.

20 La Fig. 7 ilustra la determinación de la dosis de radiación protegida por CBLB601. El Panel A muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal de PBS 24 h antes de la irradiación. El Panel B muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal de 3 μ g de CBLB601/ratón 24 h antes de la irradiación.

25 La Fig. 8 ilustra el efecto radioprotector de la administración intramuscular de CBLB601. Se muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal de PBS o la administración intramuscular de 1, 3 ó 10 μ g de CBLB601/ratón 24 h antes de la irradiación.

La Fig. 9 representa la supervivencia después de diferentes dosis de radiación y diferentes dosis de CBLB601. Se muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10, 11 ó 12 Gy de TBI después de la administración intramuscular de PBS ó 0,3, 1, 3, 10 ó 30 μ g de CBLB601/ratón 24 h antes de la irradiación.

30 La Fig. 10 compara la supervivencia después de que se administraran diferentes dosis de CBLB601 a través de diferentes rutas. Se muestra un gráfico de barras del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal o intramuscular de diferentes dosis de CBLB601 24 h antes de la irradiación.

35 La Fig. 11 compara la supervivencia después de que se administraran diferentes dosis de CBLB601, expresadas como μ g/kg, a través de diferentes rutas. Se muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal o intramuscular de diferentes dosis de CBLB601 24 h antes de la irradiación.

40 La Fig. 12 ilustra la determinación del tiempo óptimo para la inyección intramuscular de CBLB601. El Panel A muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intramuscular de PBS ó 3 μ g de CBLB601/ratón 24, 6, 3 ó 1 h antes de la irradiación ó 1 ó 3 h después de la irradiación. El Panel B muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intramuscular de PBS ó 3 μ g de CBLB601/ratón 48, 36, 24, 12 ó 6 antes de la irradiación. El Panel C muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intramuscular de PBS ó 1, 3, 10; ó 30 μ g de CBLB601/ratón 1 h después de la irradiación.

45 La Fig. 13 compara la supervivencia como una función del tiempo de administración y ruta de administración de CBLB601. Se muestra un gráfico de barras del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intraperitoneal o intramuscular de 3 μ g de CBLB601/ratón a varios tiempos antes de la irradiación.

50 La Fig. 14 ilustra la determinación del Factor Modificador de Dosis en el día 30 (DMF₃₀) para CBLB601 bajo las condiciones radioprotectoras óptimas. Se muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a

varias dosis de radiación después de la administración intramuscular de PBS ó 3 µg de CBLB601/ratón 24 h antes de la irradiación.

5 La Fig. 15 presenta un gráfico de los pesos medios de bazo de ratones irradiados control y tratados con CBLB601. Se representa la proporción del peso del bazo por peso corporal para ratones expuestos a 0, 6 ó 10 Gy de TBI después de la administración intramuscular de PBS ó 3 µg de CBLB601/ratón 24 h antes de la irradiación.

10 La Fig. 16 representa las respuestas inmunes de ratones tratados con CBLB601 que se inmunizaron con flagelina 8, 18 ó 20 semanas después de la irradiación. El Panel A muestra la respuesta inmune de los diferentes grupos un mes después de la primera inmunización. El Panel B muestra la respuesta inmune de los diferentes grupos un mes después del primer sangrado. El Panel C muestra la respuesta inmune secundaria a flagelina de los diferentes grupos 10 días después de la tercera inmunización.

La Fig. 17 es un gráfico de la activación de un NF-κB informador por varias dosis de CBLB613 y CBLB601 en células 293 que expresan el heterodímero TLR2/TLR6.

15 La Fig. 18 presenta la activación de un NF-κB informador por varios compuestos CBLB en células 293 que expresan el heterodímero TLR2/TLR6. El Panel A presenta la activación de NF-κB por varias dosis de CBLB601, CBLB612, CBLB614 o CBLB615. El Panel B presenta la activación de NF-κB por varias dosis de CBLB601, CBLB612, CBLB614 o CBLB615 y la ausencia de activación por los péptidos libres correspondientes.

La Fig. 19 es un gráfico de la activación de un NF-κB informador por varias dosis de CBLB617 y CBLB601 en células 293 que expresan el heterodímero TLR2/TLR6.

20 La Fig. 20 ilustra la actividad radioprotectora de CBLB613. Se muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intramuscular de PBS ó 0,3, 1, 3, 10, 30 ó 82,5 µg de CBLB613/ratón 24 h antes de la irradiación.

La Fig. 21 ilustra la actividad radioprotectora de CBLB612, CBLB614 y CBLB615. Se muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones expuestos a 10 Gy de TBI después de la administración intramuscular de PBS o varias dosis de CBLB612, CBLB614 o CBLB615 24 h antes de la irradiación.

25 La Fig. 22 ilustra la actividad mitigativa de CBLB612. Se muestra un gráfico del porcentaje de supervivencia de ratones tratados con 50 µg de CBLB612/ratón o PBS 1 h después de la exposición a 8,5, 9 ó 10 Gy de TBI.

Descripción detallada

30 En la presente memoria se proporciona el uso de una composición según la invención en un método para proteger a células y tejidos normales de la apoptosis causada por una variedad de estreses. La apoptosis funciona normalmente para "limpiar" tejidos de células lesionadas o genéticamente dañadas, mientras las citoquinas movilizan el sistema de defensa del organismo frente al estrés. Sin embargo, bajo condiciones de lesión grave, ambos mecanismos de respuesta al estrés pueden actuar por sí mismos como causas de muerte. Por ejemplo, la letalidad de la radiación puede resultar de la apoptosis masiva que ocurre en los sistemas hematopoyético, inmune y digestivo.

35 Existen dos mecanismos principales que controlan la apoptosis en la célula: la ruta de p53 (pro-apoptótica) y NF-κB (anti-apoptótica). Ambas rutas están frecuentemente desreguladas en tumores: p53 puede perderse, mientras que NF-κB puede volverse constitutivamente activo. Por lo tanto, la inhibición de p53 y/o la activación de NF-κB en las células normales puede protegerlas de la muerte causada por los estreses. Dicha estrategia en los tratamientos del cáncer no haría a las células tumorales más resistentes al tratamiento porque éstas pueden tener estos mecanismos de control ya desregulados. Esto contradice la visión convencional sobre p53 y NF-κB, que se consideran como dianas para la activación y represión, respectivamente.

40 Como se describe en la presente memoria, la actividad de NF-κB puede inducirse para proteger a las células normales de la apoptosis. Mediante la inducción de la actividad de NF-κB en un mamífero, las células normales pueden protegerse de la apoptosis atribuible al estrés celular. Una vez que las células normales se recuperan del estrés, la actividad de NF-κB puede restaurarse a niveles normales. Mediante la inducción temporal de la actividad de NF-κB, las células pueden protegerse de una variedad de estreses. Esto puede proporcionar un control tanto sobre las respuestas inflamatorias como sobre las decisiones vida-muerte de las células de tejidos y órganos dañados.

El papel protector de NFκB puede estar mediado por la activación transcripcional de múltiples genes que codifican: a) proteínas anti-apoptóticas que bloquean las dos rutas apoptóticas principales, b) citoquinas y factores de crecimiento que inducen la proliferación y supervivencia de células hematopoyéticas y otras células madre, y c) proteínas antioxidantes

5 secuestradoras de ROS potentes, tales como MnSOD (SOD-2). Así, por ejemplo, mediante la activación transitoria de NF- κ B para radioprotección, puede ser posible conseguir no sólo la supresión de apoptosis en pacientes con cáncer, sino también la capacidad de reducir la proporción de la incidencia de cáncer secundario debido a sus efectos inmunostimuladores simultáneos, que pueden conseguirse si la activación de NF- κ B está mediada por receptores semejantes a Toll.

10 Otra propiedad atractiva de la ruta NF- κ B como una diana es su activación por numerosos factores naturales. Entre éstos están múltiples patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Los PAMP están presentes sólo en microorganismos y no se encuentran en el organismo huésped, son característicos de grandes grupos de patógenos y no pueden mutarse fácilmente. Son reconocidos por receptores semejantes a Toll (TLR), los elementos sensores clave de la inmunidad innata. Los TLR actúan como un primer mecanismo de advertencia del sistema inmune induciendo la migración y activación de las células inmunes directamente o a través de la liberación de citoquinas. Los TLR son proteínas de membrana de tipo I, que se sabe que funcionan como homo y heterodímeros. Después de la unión del ligando, los TLR reclutan la proteína MyD88, un adaptador de la señalización indispensable para la mayor parte de los TLR. La cascada de señalización que sigue da lugar a efectos que incluyen (i) activación de la ruta NF- κ B, y (ii) activación de MAPK, incluyendo la quinasa N terminal de Jun (JNK). A diferencia de las citoquinas, muchos PAMP tienen un efecto pequeño aparte de la activación de los TLR y así, es improbable que produzcan efectos secundarios. Además, numerosos TLR (TLR1-TLR10) están presentes en los seres humanos. Consistente con su función de activación de inmunocitos, todos los TLR se expresan en leucocitos de bazo y sangre periférica, con más patrones de expresión específicos de TLR en otros órganos linfoides y subconjuntos de leucocitos. Todos los TLR también se expresan en las células endoteliales y epiteliales mucosales de la piel y los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario.

1. Definiciones

25 Debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es sólo para el propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante. Debe indicarse que, tal y como se usa en la especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen los referentes plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa.

El término "administrar" cuando se usa para describir la dosificación de un agente que induce la actividad de NF- κ B, significa una única dosis o múltiples dosis del agente.

30 El término "alifático" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo hidrocarbonado no ramificado, ramificado o cíclico, que puede estar sustituido o no sustituido, y que puede ser saturado o insaturado, pero que no es aromático. El término alifático incluye además grupos alifáticos, que comprenden átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo que reemplazan uno o más carbonos del núcleo hidrocarbonado.

35 El término "alquilo" tal y como se usa en la presente memoria solo o en combinación se refiere a un grupo alifático saturado ramificado o no ramificado. Los ejemplos representativos de grupos alquilo incluyen, pero no están limitados a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, octilo, decilo, tetradecilo, hexadecilo, eicosilo, tetracosilo y semejantes.

El término "alqueno" tal y como se usa en la presente memoria solo o en combinación se refiere a un grupo alifático insaturado ramificado o no ramificado que contiene al menos un enlace doble carbono-carbono que puede aparecer en cualquier punto estable a lo largo de la cadena. Los ejemplos representativos de grupos alqueno incluyen, pero no están limitados a, etenilo, E y Z-pentenilo, decenilo y semejantes.

40 El término "alquino" tal y como se usa en la presente memoria solo o en combinación se refiere a un grupo alifático insaturado ramificado o no ramificado que contiene al menos un enlace triple carbono-carbono que puede aparecer en cualquier punto estable a lo largo de la cadena. Los ejemplos representativos de grupos alquino incluyen, pero no están limitados a, etinilo, propinilo, propargilo, butinilo, hexinilo, decinilo y semejantes.

45 El término "análogo" cuando se usa en el contexto de un péptido o polipéptido, significa un péptido o polipéptido que comprende uno o más aminoácidos no estándar u otras variaciones estructurales del conjunto convencional de aminoácidos.

50 El término "anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria significa un anticuerpo de las clases IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, o fragmentos o derivados de éstos, incluyendo Fab, F(ab')₂, Fd y anticuerpos de cadena única, fragmentos divalentes, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos bifuncionales y derivados de éstos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo purificado por afinidad o mezclas de éstos que presenta una especificidad de unión suficiente a un epítipo deseado o una secuencia obtenida de éste. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede derivatizarse por la unión de uno o más restos químicos, peptídicos o polipeptídicos conocidos en la técnica. El anticuerpo puede estar conjugado con un resto químico.

- El término "apoptosis" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una forma de muerte celular que incluye la contracción progresiva del volumen celular con la conservación de la integridad de los orgánulos citoplásmicos; condensación de la cromatina (es decir, condensación nuclear), según se observa por microscopía óptica o electrónica; y/o escisión del ADN en fragmentos con el tamaño de un nucleosoma, según se determina por ensayos de sedimentación por centrifugación. La muerte celular ocurre cuando se pierde la integridad de la membrana de las células (por ejemplo, aparición de protuberancias ("blebbing") en la membrana) con engullimiento de fragmentos celulares intactos ("cuerpos apoptóticos") por las células fagocíticas.
- El término "cáncer" tal y como se usa en la presente memoria significa cualquier afección caracterizada por resistencia a los estímulos apoptóticos.
- El término "tratamiento del cáncer" tal y como se usa en la presente memoria significa cualquier tratamiento para el cáncer conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, quimioterapia y terapia con radiación.
- El término "combinación con" cuando se usa para describir la administración de un agente que induce la actividad de NF- κ B y un tratamiento adicional significa que el agente puede administrarse antes de, junto a, o después del tratamiento adicional, o una combinación de éstos.
- El término "derivado" cuando se usa en el contexto de un péptido o polipéptido, significa un péptido o polipéptido diferente aparte de en la estructura primaria (aminoácidos y análogos de aminoácidos). Como ilustración, los derivados pueden diferenciarse por estar glicosilados, una forma de modificación posterior a la traducción. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos pueden presentar patrones de glicosilación debidos a la expresión en sistemas heterólogos. Si al menos se retiene una actividad biológica, entonces estos péptidos o polipéptidos son derivados según la invención. Otros derivados incluyen, pero no están limitados a, péptidos de fusión o polipéptidos de fusión que tienen un extremo N o C modificado covalentemente, péptidos o polipéptidos PEGilados, péptidos o polipéptidos asociados con restos lipídicos, péptidos o polipéptidos alquilados, péptidos o polipéptidos unidos mediante un grupo funcional de la cadena lateral de un aminoácido a otros péptidos, polipéptidos o compuestos químicos y modificaciones adicionales como se entenderá en la técnica.
- El término "fragmento" cuando se usa en el contexto de un péptido o polipéptido, puede significar un péptido con una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 aminoácidos. El fragmento puede tener una longitud de 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos.
- El término "homólogo" cuando se usa en el contexto de un péptido o polipéptido, significa un péptido o polipéptido que comparte un ancestro evolutivo común.
- El término "saturado" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo en el que todos los enlaces de valencia disponibles de los átomos del núcleo están unidos a otros átomos.
- El término "sustituido" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo que tiene uno o más hidrógenos u otros átomos eliminados de un carbono y reemplazados por un grupo adicional. Los grupos sustituidos en la presente memoria pueden estar sustituidos con uno a cinco, o uno a tres sustituyentes. Los ejemplos representativos de dichos sustituyentes incluyen, pero no están limitados a, grupos alifáticos, grupos aromáticos, alquilo, alqueno, alquino, arilo, alcoxi, halo, arilo, carbonilo, acilo, ciano, amino, nitro, grupos que contienen fosfato, grupos que contienen azufre, hidroxilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, acilamino, amidino, imino, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, alquilsulfonilo, trifluorometilo, azido, heterociclilo, alquilarilo, heteroarilo, semicarbazido, tiosemicarbazido, maleimido, oximino, imidato, cicloalquilo, cicloalquilcarbonilo, dialquilamino, arilcicloalquilo, arilcarbonilo, arilalquilcarbonilo, arilcicloalquilcarbonilo, arilfosfinilo, arilalquilfosfinilo, arilcicloalquilfosfinilo, arilfosfonilo, arilalquilfosfonilo, arilcicloalquilfosfonilo, arilsulfonilo, arilalquilsulfonilo, arilcicloalquilsulfonilo, combinaciones de éstos y sustituciones de éstos.
- El término "tratar" o "tratando" cuando se refiere a la protección de un mamífero de una afección, significa prevenir, suprimir, reprimir o eliminar la afección. Prevenir la afección implica administrar una composición de esta invención a un mamífero antes del inicio de la afección. Suprimir la afección implica administrar una composición de esta invención a un mamífero después de la inducción de la afección pero antes de su aparición clínica. Reprimir la afección implica administrar una composición de esta invención a un mamífero después de la aparición clínica de la afección de manera que la afección se reduce o mantiene. Eliminar la afección implica administrar una composición de esta invención a un mamífero después de la aparición clínica de la afección de manera que el mamífero no padece la afección por más tiempo.
- El término "célula tumoral" tal y como se usa en la presente memoria significa cualquier célula caracterizada por resistencia a estímulos apoptóticos.

El término "insaturado" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo en el que al menos un enlace de valencia disponible de dos átomos de núcleo adyacentes no está unido a otros átomos.

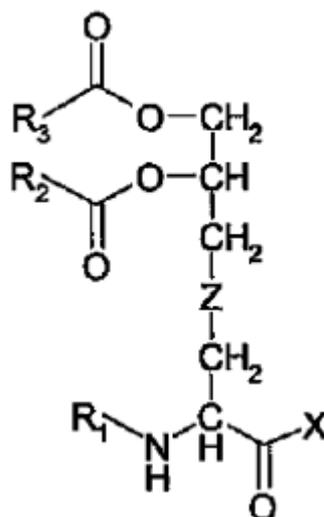
El término "no sustituido" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un grupo que no tiene ningún grupo adicional unido a él o por ello sustituido.

- 5 El término "variante" cuando se usa en el contexto de un péptido o polipéptido, significa un péptido o polipéptido que se diferencia en la secuencia de aminoácidos por la inserción, delección o sustitución conservativa de aminoácidos, pero que retiene al menos una actividad biológica. Para los propósitos de esta invención, "actividad biológica" incluye, pero no está limitado a, la capacidad de ser unido por un anticuerpo específico. Una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, reemplazar un aminoácido con un aminoácido diferente con propiedades similares (por ejemplo, hidrofili-
 10 grado y distribución de regiones cargadas) se reconoce en la técnica como que implica típicamente un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, como se entiende en la técnica (Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132, 1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de sus hidrofobicidad y carga. Se sabe en la técnica que los aminoácidos con índices hidropáticos similares pueden sustituirse y todavía retienen la función proteica. En un aspecto, se sustituyen los aminoácidos que
 15 tienen índices hidropáticos de ± 2 . La hidrofili-
 20 actividad biológica, por ejemplo inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. En un aspecto, las sustituciones se realizan con aminoácidos que tienen valores de hidrofili-
 25 dad en ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofili-
 dad de los aminoácidos se ven influidos por la cadena lateral particular de ese aminoácido. Consistente con esta observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos y particularmente de las cadenas laterales de esos aminoácidos, como se revela por la hidrofobicidad, hidrofili-
 dad, carga, tamaño y otras propiedades.

2. Lipopéptidos

- Un lipopéptido puede usarse como un agente para inducir la actividad de NF- κ B. Los lipopéptidos son parte de las membranas externas de las bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas y micoplasma. Los lipopéptidos bacterianos no tienen homología de secuencia compartida, pero se caracterizan por el aminoácido N-terminal inusual S-
 30 (2,3-dihidroxipropil)-L-cisteína que está acilado por dos o tres ácidos grasos. Los lipopéptidos bacterianos son moduladores inmunes fuertes que activan las respuestas tempranas del huésped después de la infección por señalización a través de los heterodímeros TLR2-TLR1 o TLR2-TLR6, dando lugar a la activación de NF- κ B y la producción de citoquinas. Los análogos sintéticos de los lipopéptidos N-terminales de los lipopéptidos naturales son activadores potentes de los TLR y NF- κ B, así como son inmunoadyuvantes in vivo e in vitro.

- 35 El lipopéptido es un compuesto de la fórmula:



en la que,

R₁ representa H o -CO-R₄,

R₂, R₃ y R₄ son independientemente H o alifático sustituido opcionalmente;

X es un péptido; y

5 Z es S o CH₂.

El lipopéptido puede comprender dos o tres ácidos grasos. Los sustituyentes alifáticos de R₂, R₃ y R₄ comprenden de 6 a 20 átomos de carbono. R₂, R₃ y R₄ pueden ser alquilo C₆-C₂₀, alquenilo C₆-C₂₀, o alquinilo C₆-C₂₀. Los ejemplos representativos de sustituyentes alquilo en R₂, R₃ y R₄ incluyen C₆, C₈, C₉, C₁₀, C₁₂, C₁₄ y C₁₆. Los ejemplos representativos de sustituyentes alquenilo en R₂, R₃ y R₄ incluyen C_{10:1}^{D1 trans}, C_{18:1}^{D9} y C_{18:2}^{D9, 12}.

10 El péptido puede portar una carga negativa neta.

Tabla 1

Secuencia	Longitud	SEQ ID NO
SNNA	4	1
GSSH	5	2
KQNV	5	3
NNSGK	5	4
QPDRY	5	5
RPDRY	5	6
SEEEE	5	7
SKKKK	5	8
SNNNA	5	9
SPPPP	5	10
GQHMM	5	11
GQHMM	5	12
SSHMM	5	13
GSHMM	5	14
SQMHH	5	15
GETDK	5	16
GEESN	5	17
GEEDD	5	18
TENVKE	6	19
QGEESNDIC	8	20
VQGEESNDK	9	21
FEPPPATT	9	22

ES 2 421 447 T3

Secuencia	Longitud	SEQ ID NO
GDKYFKETE	9	23
GDPKHPKSF	9	24
GGQEKSAAG	9	25
GPCPGCPPC	9	26
PPCPGCPPC	9	27
DNEEKPTPEQD	11	28
GNGGAPAQPKG	11	29
FEPPPATTTKSK	12	30
GNNDESNISFKEK	13	31
GDPKHPKSFTGWVA	14	32
AQNPKNKTNSLDSSK	15	33
NKDNEAEPVTEGNAT	15	34
SKEGNPDPDNAAKS	15	35
GDKTPSTKSAGKVENK	16	36
GETDKEGKIIRIFDNSF	17	37
SSTSENNGNGNGGGTD	17	38
GNNDESNISFKEKSEEEE	18	39
GNNDESNISFKEKSKKKK	18	40
GNNDESNISFKEKSPPPP	18	41
SSNKSTTGSGETTTAAGT	18	42
CGNNDESNISFKEKSKKKK	19	43
GSPLSFESSVQLIVSDNSS	19	44
SNYAKKVVQKNHVYTPVY	19	45
ADVIKIVEIVKGLIDQFTQK	21	46
GAASSLTYESSVQLVVSDNSS	21	47
GGEPAAQAPAETPAAAAEAAS	21	48
GQTDNNSQSQQPGSGTTNT	21	49
SGALAATSDDDVKKAATVAIVA	22	50
SIVSTIIEVKTIVDIVKKFKK	22	51
SSGGGGVAADIGAGLADALTAP	22	52

Las SEQ ID NOS. 1 a 20 y 22 a 52 se listan sólo para propósitos de ilustración.

El lipopéptido puede ser un estereoisómero RR o RS, o mezcla de éstos, respecto a la estereoquímica del ácido lipoamino N-terminal. El lipopéptido puede ser soluble en agua.

3. Tratamiento del estrés

5 Un agente que induce la actividad de NF- κ B puede usarse para proteger a las células normales de afecciones o tratamientos que causan estreses celulares, desencadenando de esta manera la apoptosis. Los ejemplos representativos de afecciones o tratamientos incluyen tratamientos del cáncer, por ejemplo, terapia con radiación o quimioterapia; choque térmico; exposición a dosis perjudiciales de radiación, por ejemplo, trabajadores en centrales nucleares, la industria de defensa o producción radiofarmacéutica, o soldados; envejecimiento celular; lesión; envenenamiento; e infección.

10 El agente puede administrarse simultáneamente o metronómicamente con otros tratamientos. El término "simultáneo" o "simultáneamente" tal y como se usa en la presente memoria, significa que el agente y otro tratamiento se administran en 48 horas, preferiblemente 24 horas, más preferiblemente 12 horas, aún más preferiblemente 6 horas y lo más preferiblemente 3 horas o menos, uno de otro. El término "metronómicamente" tal y como se usa en la presente memoria significa la administración del agente en tiempos diferentes del otro tratamiento y a una determinada frecuencia relativa a la administración repetida.

15 El agente puede administrarse en cualquier punto antes de la exposición al estrés incluyendo, pero no limitado a, aproximadamente 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h ó 1 h antes de la exposición. El agente puede administrarse en cualquier punto después de la exposición al estrés incluyendo, pero no limitado a, aproximadamente 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 20 16 h, 18 h, 20 h, 22 h, 24 h, 26 h, 28 h, 30 h, 32 h, 34 h, 36 h, 38 h, 40 h, 42 h, 44 h, 46 h ó 48 h después de la exposición.

a. Cáncer con NF- κ B constitutivamente activo

La afección puede ser un cáncer con NF- κ B constitutivamente activo. El agente que induce la actividad de NF- κ B puede administrarse en combinación con un tratamiento del cáncer, tal como quimioterapia o terapia con radiación.

25 El tratamiento del cáncer puede comprender la administración de un agente citotóxico o agente citostático, o combinación de éstos. Los agentes citotóxicos evitan que las células cancerosas se multipliquen por: (1) interferencia con la capacidad de la célula de replicar el ADN e (2) inducción de la muerte celular y/o apoptosis en las células cancerosas. Los agentes citostáticos actúan mediante la modulación, interferencia o inhibición de los procesos de la transducción de la señal celular que regulan la proliferación celular.

30 Las clases de compuestos que pueden usarse como agentes citotóxicos incluyen los siguientes: agentes alquilantes (incluyendo, sin limitación, mostazas de nitrógeno, derivados etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos); mostaza de uracilo, clorometina, ciclofosfamida (Cytoxan®), ifosfamida, melfalán, clorambucilo, pipobromano, trietilenmelamina, trietilfosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptoizocina, dacarbazina y temozolomida; antimetabolitos (incluyendo, sin limitación, antagonistas del ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa): metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina; productos naturales y sus derivados (por ejemplo, alcaloides de vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfoquinas y epipodofilotoxinas): vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, ara-c, paclitaxel (el paclitaxel está disponible comercialmente como Taxol®), mitramicina, desoxico-formicina, mitomicina-c, 1-asparaginasa, 40 interferones (preferiblemente IFN- α), etopósido y tenipósido.

Otros agentes citotóxicos proliferativos son navelbeno, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

45 Los agentes que afectan los microtúbulos interfieren con la mitosis celular y son muy conocidos en la técnica por su actividad citotóxica. Los agentes que afectan los microtúbulos que pueden usarse incluyen, pero no están limitados a, alocolicina (NSC 406042), halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410), dolastatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (Taxol®, NSC 125973), derivados de Taxol® (por ejemplo, derivados (por ejemplo, NSC 608832), tiocolchicina NSC 361792), tritil cisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), epotilonas naturales y sintéticas incluyendo pero no limitado a epotilona A, epotilona B y discodermolida (véase, Service, (1996) Science, 274: 50 2009) estramustina, nocodazol, MAP4, y semejantes. Los ejemplos de dichos agentes también se describen en Bulinski (1997) J. Cell. Sci. 110: 3055 3064; Panda (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10560-10564; Muhlradt (1997) Cancer

Res. 57: 3344-3346; Nicolaou (1997) Nature 387: 268-272; Vasquez (1997) Mol. Biol. Cell. 8: 973-985; y Panda (1996) J. Biol. Chem. 271: 29807-29812.

5 También son adecuados los agentes citotóxicos tales como epidofilotoxina; una enzima antineoplásica; un inhibidor de topoisomerasa; procarbazona; mitoxantrona; complejos de coordinación de platino tales como cisplatino y carboplatino; modificadores de la respuesta biológica; inhibidores del crecimiento; agentes terapéuticos antihormonales; leucovorina; tegafur; y factores de crecimiento hematopoyéticos.

10 Los agentes citostáticos que pueden usarse incluyen, pero no están limitados a, hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos): 17 α -etinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, acetato de megestrol, metilprednisolona, metil-testosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolido, flutamida, toremifeno y zoladex.

15 Otros agentes citostáticos son antiangiogénicos, tales como inhibidores de metaloproteinasas de la matriz, y también están incluidos otros inhibidores de VEGF, tales como anticuerpos anti-VEGF y moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU6668. También pueden utilizarse los anticuerpos anti-Her2 de Genentech. Un inhibidor de EGFR adecuado es EKB-569 (un inhibidor irreversible). También están incluidos el anticuerpo C225 Imclone inmunoespecífico para el EGFR y los inhibidores de src.

20 También es adecuado para usarse como un agente citostático Casodex® (bicalutamida, Astra Zeneca) que hace que los carcinomas dependientes de andrógenos se vuelvan no proliferativos. Otro ejemplo más de un agente citostático es el antiestrógeno Tamoxifen® que inhibe la proliferación o crecimiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos. Los inhibidores de la transducción de señales celulares proliferativas son agentes citostáticos. Los ejemplos representativos incluyen inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de Her-2, inhibidores de la MEK-1 quinasa, inhibidores de la MAPK quinasa, inhibidores de PI3, inhibidores de la Src quinasa e inhibidores de PDGF.

25 El tratamiento del cáncer puede comprender terapia con radiación. La terapia con radiación puede ser radiación con rayo externo, terapia con radiación interna o terapia con radiación conformada, en la que se usa un ordenador para dar forma al rayo de la radiación para que coincida con la forma del tumor. La radiación usada en la terapia con radiación puede proceder de una variedad de fuentes, incluyendo un rayo x, rayo de electrones o rayos gamma. Las dosis y momento de la administración de la radiación durante la terapia con radiación pueden variar y variarán dependiendo de la localización y magnitud del cáncer. El agente que induce actividad la de NF- κ B puede administrarse con un agente radioprotector (véase la sección 3d) en combinación con la terapia con radiación, como se ha descrito anteriormente.

30 Los cánceres que pueden tratarse incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: carcinoma incluyendo el de vejiga (incluyendo cáncer de vejiga acelerado y metastásico), mama, colon (incluyendo cáncer colorrectal), riñón, hígado, pulmón (incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), ovario, próstata, testículos, tracto genitourinario, sistema linfático, laringe, páncreas (incluyendo carcinoma pancreático exocrino), boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto, vesícula biliar, cuello del útero, tiroides y piel (incluyendo carcinoma de células escamosas); tumores hematopoyéticos del linaje linfocítico incluyendo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma histiocítico y linfoma de Burkett; tumores hematopoyéticos del linaje mielocítico incluyendo leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielocítica y leucemia promielocítica; tumores del sistema nervioso central y periférico incluyendo astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; tumores de origen mesenquimático incluyendo fibrosarcoma, rhabdomioma y osteosarcoma; y otros tumores incluyendo melanoma, xenoderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer de tiroides folicular y teratocarcinoma.

b. Tratamiento de los efectos secundarios del tratamiento del cáncer

45 La afección también puede ser daño al tejido normal atribuible al tratamiento de un cáncer con NF- κ B constitutivamente activo. El agente que induce la actividad de NF- κ B puede administrarse en combinación con un tratamiento del cáncer como se ha descrito anteriormente.

c. Modulación del envejecimiento celular

La afección también puede ser el envejecimiento celular.

d. Radiación

50 La afección también puede ser exposición a radiación. La exposición a radiación ionizante (IR) puede ser a corto o largo plazo, puede aplicarse como una única dosis o múltiples dosis, en el cuerpo completo o localmente. Así, los accidentes

5 nucleares o ataques militares pueden implicar la exposición a una única dosis alta de irradiación del cuerpo completo (algunas veces seguida de un envenenamiento a largo plazo con isótopos radiactivos). Asimismo, una única dosis de radiación se usa generalmente para el pretratamiento de pacientes con trasplante de médula ósea cuando es necesario preparar los órganos hematopoyéticos del huésped para la médula ósea del donante "limpiándolos" de los precursores sanguíneos del huésped.

10 A nivel molecular y celular, las partículas de radiación pueden dar lugar a rotura en el ADN y al entrecruzamiento entre ADN, proteínas, membranas celulares y otras estructuras macromoleculares. La radiación ionizante también puede inducir un daño secundario en los componentes celulares elevando los radicales libres y las especies de oxígeno reactivas (ROS). Múltiples sistemas de reparación contrarrestan este daño, tales como varias rutas de reparación del ADN que restauran la integridad y fidelidad del ADN, y compuestos químicos y enzimas antioxidantes que secuestran los radicales libres y ROS y reducen las proteínas y lípidos oxidados. Los sistemas de regulación del ciclo celular están presentes para detectar los defectos del ADN y retrasar la progresión del ciclo celular hasta que el daño se repara o se toma una decisión para destinar a la célula a parada del crecimiento o muerte celular programada (apoptosis).

15 A nivel de organismo, los efectos inmediatos de niveles bajos y moderados de radiación están causados en gran medida por la muerte celular, que da lugar a inflamación inducida por radiación. A niveles mayores de radiación, los denominados síndromes hematopoyéticos y gastrointestinales dan lugar a la muerte inducida por radiación a corto plazo. El síndrome hematopoyético se caracteriza por la pérdida de células hematopoyéticas y sus progenitores, haciendo de esta manera imposible regenerar la sangre y el sistema linfóide. La muerte ocurre habitualmente como una consecuencia de infección (debida a inmunosupresión), hemorragia y/o anemia. El síndrome gastrointestinal se caracteriza por muerte celular masiva en el epitelio intestinal, predominantemente en el intestino delgado, seguido de la desintegración de la pared intestinal y muerte por bacteriemia y sepsis. El síndrome hematopoyético se manifiesta en sí mismo a dosis menores de radiación y da lugar a una muerte más retrasada que el síndrome gastrointestinal. Unas dosis muy altas de radiación pueden causar una muerte casi instantánea por incitación de la degeneración neuronal.

20 Los organismos que sobreviven un periodo de toxicidad aguda de radiación pueden padecer consecuencias a largo plazo que incluyen carcinogénesis y fibrosis inducidas por radiación que se desarrollan en los órganos expuestos (por ejemplo, riñón, hígado o pulmones) meses e incluso años después de la irradiación.

25 Los inductores de NF- κ B poseen una fuerte actividad pro-supervivencia al nivel celular y pueden usarse para tratar los efectos de los eventos de la radiación natural, exposición a dosis bajas de radiación, radiación administrada como parte de terapia del cáncer o accidentes nucleares. Además, como los inductores de NF- κ B actúan a través de mecanismos diferentes de todos los radioprotectores conocidos actualmente, pueden usarse en combinación con otros radioprotectores, incrementando de esta manera dramáticamente la escala de protección frente a la radiación ionizante.

30 Históricamente, los radioprotectores han sido generalmente antioxidantes y secuestradores de radicales libres - tanto sintéticos como naturales. Más recientemente, las citoquinas y los factores de crecimiento se han añadido a la lista de radioprotectores; se considera que el mecanismo de su radioprotección se debe a su efecto facilitador de la regeneración de los tejidos sensibles. No existe una distinción funcional clara entre los dos grupos de radioprotectores, sin embargo, como algunas citoquinas inducen la expresión de las proteínas celulares antioxidantes, tales como manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) y metalotioneína, su uso puede ser ventajoso.

35 Los radioprotectores pueden ser cualquier agente que trata los efectos de la exposición a la radiación incluyendo, pero no limitado a, antioxidantes, secuestradores de radicales libres, citoquinas, flagelina y TGF β latente. Los antioxidantes y los secuestradores de radicales libres que pueden usarse incluyen, pero no están limitados a, tioles, tales como cisteína, cisteamina, glutatión y bilirrubina; amifostina (WR-2721); vitamina A; vitamina C; vitamina E; y flavonoides tales como albahaca sagrada de la India (*Ocimum sanctum*), orientina y vicenina. Las citoquinas y factores de crecimiento confieren radioprotección reponiendo y/o protegiendo las poblaciones de células madre radiosensibles. Las citoquinas que pueden usarse incluyen factor de células madre (SCF, ligando c-kit), ligando Fit-3, interleuquina-1 fragmento IL-1b-rd y factor de crecimiento de queratinocitos (KGF). Varios otros factores, aunque no de naturaleza citoquina, estimulan la proliferación de los inmunocitos, y así, pueden usarse. Éstos incluyen, 5-AED (5-androstenediol), que es un esteroide que estimula la expresión de citoquinas, y compuestos sintéticos, tales como tricloro(dioxoetilen-O,O') telurato de amonio (AS-101). El TGF β latente, flagelina y derivados de flagelina son inductores fuertes de la actividad de NF- κ B como se muestra en las Solicitudes de Patente Internacional Nos. PCT/US2004/040656 y PCT/US2004/040753 y en la Solicitud de Patente U.S. No. 60/693.826.

4. Composición

En la presente memoria también se proporcionan composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un inductor de NF- κ B. La composición puede ser una composición farmacéutica, que puede producirse usando métodos muy conocidos en la técnica. Como se ha descrito anteriormente, la composición que comprende un inductor

de NF- κ B puede administrarse a un mamífero para el tratamiento de afecciones asociadas con la apoptosis incluyendo, pero no limitado a, exposición a radiación, efecto secundario de los tratamientos del cáncer, estrés y envejecimiento celular. La composición también puede comprender agentes adicionales incluyendo, pero no limitado a, un radioprotector o un fármaco quimioterapéutico.

5 a. Administración

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden administrarse de cualquier manera incluyendo, pero no limitado a, oralmente, parenteralmente, sublingualmente, transdérmicamente, rectalmente, transmucosalmente, tópicamente, vía inhalación, vía administración bucal o combinaciones de éstas. La administración parenteral incluye, pero no está limitada a, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal e intraarticular. Para uso veterinario, la composición puede administrarse como una formulación adecuadamente aceptable según la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente el régimen de dosificación y ruta de administración que es la más apropiada para un animal particular.

b. Formulación

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria pueden estar en la forma de comprimidos o pastillas formulados de una manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales incluyendo, pero no limitado a, agentes de aglutinación, rellenos, lubricantes, disgregantes y agentes humectantes. Los agentes aglutinantes incluyen, pero no están limitados a, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, goma de tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Los rellenos incluyen, pero no están limitados a, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero no están limitados a, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilén glicol y sílice. Los disgregantes incluyen, pero no están limitados a, almidón de patata y glicolato sódico de almidón. Los agentes humectantes incluyen, pero no están limitados a, lauril sulfato sódico. Los comprimidos pueden recubrirse según métodos muy conocidos en la técnica.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden ser formulaciones líquidas incluyendo, pero no limitado a, suspensiones acuosas o grasas, disoluciones, emulsiones, jarabes y elixires. Las composiciones también pueden formularse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos incluyendo, pero no limitado a, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. El agente de suspensión incluye, pero no está limitado a, sorbitol, jarabe, metil celulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetil celulosa, gel de estearato de aluminio y grasas hidrogenadas comestibles. Los agentes emulsionantes incluyen, pero no están limitados a, lecitina, monooleato de sorbitán y goma arábiga. Los vehículos no acuosos incluyen, pero no están limitados a, aceites comestibles, aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres grasos, propilén glicol y alcohol etílico. Los conservantes incluyen, pero no están limitados a, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden formularse como supositorios, que pueden contener bases de supositorio incluyendo, pero no limitado a, mantequilla de cacao o glicéridos. Las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden formularse para inhalación, que pueden estar en una forma incluyendo, pero no limitado a, una disolución, suspensión o emulsión que puede administrarse como un polvo seco o en la forma de un aerosol usando un propelente, tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano. Las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden formularse como formulaciones transdérmicas que comprenden vehículos acuosos o no acuosos incluyendo, pero no limitado a, cremas, pomadas, lociones, pastas, apósito medicado, parche o membrana.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden formularse para administración parenteral incluyendo, pero no limitado a, por inyección o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden estar en la forma de suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos grasos o acuosos y pueden contener agentes de formulación incluyendo, pero no limitado a, agentes de suspensión, estabilizantes y dispersantes. La composición también puede proporcionarse en una forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado incluyendo, pero no limitado a, agua estéril sin pirógenos.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria también pueden formularse como una preparación de liberación lenta, que puede administrarse por implante o por inyección intramuscular. Las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (como una emulsión en un aceite aceptable, por ejemplo), resinas de intercambio iónico o como derivados moderadamente solubles (como una sal moderadamente soluble, por ejemplo).

c. Dosificación

Una cantidad terapéuticamente eficaz del agente requerida para uso en terapia varía con la naturaleza de la afección que se está tratando, el periodo de tiempo en el que se desea la inducción de la actividad de NF- κ B y la edad y la afección del paciente y es determinada en última instancia por el médico responsable. En general, sin embargo, las dosis empleadas para el tratamiento de humanos adultos están típicamente en el intervalo de 0,001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg al día. La dosis puede ser aproximadamente 1 μ g/kg a aproximadamente 100 μ g/kg al día. La dosis deseada puede administrarse convenientemente en una única dosis o como múltiples dosis administradas a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más sub-dosis al día. Las dosis múltiples se desean o requieren frecuentemente porque la actividad de NF- κ B en las células normales puede disminuir una vez que el agente deja de administrarse.

La dosificación de un inductor de NF- κ B puede ser cualquier dosificación incluyendo, pero no limitado a, aproximadamente 1 μ g/kg, 25 μ g/kg, 50 μ g/kg, 75 μ g/kg, 100 μ g/kg, 125 μ g/kg, 150 μ g/kg, 175 μ g/kg, 200 μ g/kg, 225 μ g/kg, 250 μ g/kg, 275 μ g/kg, 300 μ g/kg, 325 μ g/kg, 350 μ g/kg, 375 μ g/kg, 400 μ g/kg, 425 μ g/kg, 450 μ g/kg, 475 μ g/kg, 500 μ g/kg, 525 μ g/kg, 550 μ g/kg, 575 μ g/kg, 600 μ g/kg, 625 μ g/kg, 650 μ g/kg, 675 μ g/kg, 700 μ g/kg, 725 μ g/kg, 750 μ g/kg, 775 μ g/kg, 800 μ g/kg, 825 μ g/kg, 850 μ g/kg, 875 μ g/kg, 900 μ g/kg, 925 μ g/kg, 950 μ g/kg, 975 μ g/kg, ó 1 mg/kg.

5. Métodos de cribado

El método proporcionado en la presente memoria también se refiere a métodos para identificar agentes que inducen la actividad de NF- κ B. Un agente que induce la actividad de NF- κ B puede identificarse por un método que comprende añadir un presunto inductor de la actividad de NF- κ B a un sistema de expresión de NF- κ B activado, comparar el nivel de la expresión de NF- κ B activado con un control, mediante lo cual se identifica un inductor de la actividad de NF- κ B por la capacidad de incrementar el nivel del sistema de expresión de NF- κ B activado.

Los agentes candidatos pueden estar presentes en una biblioteca (es decir, una colección de compuestos). Dichos agentes pueden estar codificados, por ejemplo, por moléculas de ADN en una biblioteca de expresión. Los agentes candidatos pueden estar presentes en medios condicionados o en extractos celulares. Otros agentes como éstos incluyen compuestos conocidos en la técnica como "moléculas pequeñas", que tienen pesos moleculares menores de 10^5 daltons, preferiblemente menores de 10^4 daltons y aún más preferiblemente menores de 10^3 daltons. Dichos agentes candidatos pueden proporcionarse como miembros de una biblioteca combinatoria, que incluye agentes sintéticos (por ejemplo, péptidos) preparados según múltiples reacciones químicas predeterminadas. Los expertos en la técnica apreciarán que puede prepararse una selección diversa de dichas bibliotecas según procedimientos establecidos y los miembros de una biblioteca de agentes candidatos pueden cribarse simultáneamente o secuencialmente como se describe en la presente memoria.

Los métodos de cribado pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos in vitro, basados en células, e in vivo. Con los ensayos basados en células puede usarse cualquier célula. Preferiblemente, las células que pueden usarse incluyen células de mamífero, más preferiblemente células humanas y de primate no humano. El cribado basado en células puede realizarse usando células tumorales genéticamente modificadas que expresan marcadores sucedáneo para la activación de NF- κ B. Dichos marcadores incluyen, pero no están limitados a, β -galactosidasa bacteriana, luciferasa y proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). La cantidad de expresión del marcador sucedáneo puede medirse usando técnicas estándar en la técnica incluyendo, pero no limitado a, colorimetría, luminometría y fluorimetría.

Las condiciones en las cuales un presunto modulador se añade a una célula, tal como por mezclado, son condiciones en las que la célula puede experimentar apoptosis o señalización si esencialmente no están presentes otros compuestos reguladores que interferirían con la apoptosis o la señalización. Las condiciones eficaces incluyen, pero no están limitadas a, medio apropiado, condiciones de temperatura, pH y oxígeno que permiten el crecimiento celular. Un medio apropiado es típicamente un medio sólido o líquido que comprende factores de crecimiento y fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, así como sales, minerales, metales apropiados y otros nutrientes, tales como vitaminas, e incluye un medio eficaz en el que la célula puede cultivarse de manera que la célula puede presentar apoptosis o señalización. Por ejemplo, para una célula de mamífero, los medios pueden comprender medio de Eagle modificado por Dulbecco que contiene 10% de suero fetal de ternera.

Las células pueden cultivarse en una variedad de contenedores incluyendo, pero no limitado a, frascos de cultivo de tejidos, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas petri. El cultivo se lleva a cabo a una temperatura, pH y contenido de dióxido de carbono apropiados para la célula. Dichas condiciones de cultivo también están dentro de las habilidades de la técnica.

Los métodos para añadir un presunto modulador a la célula incluyen electroporación, microinyección, expresión celular (es decir, usando un sistema de expresión incluyendo moléculas de ácido nucleico desnudas, virus recombinante, vectores de expresión de retrovirus y expresión de adenovirus), uso de agentes de emparejamiento de iones y uso de detergentes para la permeabilización celular.

5 Esta invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los ejemplos siguientes no limitativos.

Ejemplo 1

La deficiencia de p53 acelera el desarrollo del síndrome GI en ratones

10 La causa principal de muerte por radiación ionizante (IR) de los mamíferos depende de la dosis de la radiación. A dosis de hasta 9-10 Gy, los ratones mueren 12-20 días más tarde, principalmente por depleción letal de la médula ósea, es decir, el síndrome hematopoyético (HP). A esta dosis, los ratones irradiados pueden rescatarse de la letalidad por trasplante de médula ósea. Los animales que recibieron >13-15 Gy mueren entre los días 7-12 después del tratamiento (antes de que el síndrome hematopoyético pudiera matarlos) por complicaciones de daño en el intestino delgado, es decir, el síndrome gastrointestinal (GI). Se sabe bien que la proliferación celular de las células epiteliales del intestino delgado está limitada a las criptas en las que están localizadas las células madre y los progenitores proliferativos
15 tempranos. Después de un par de divisiones celulares, los descendientes ya diferenciados de las células madre de la cripta ascienden por las vellosidades para ser depositados en la punta de la vellosidad. En el intestino delgado del ratón, el "viaje" completo de la célula (es decir, desde el compartimento proliferativo hasta la punta de la vellosidad) tarda normalmente entre 3 y 5 días. Aunque la reacción del intestino delgado a la radiación gamma se ha examinado bien a un nivel patomorfológico, la causa exacta de letalidad GI, incluyendo el evento primario, aún no está clara. La muerte puede
20 ocurrir como una consecuencia directa del daño a las células epiteliales de la cripta, seguido de denudación de las vellosidades dando lugar a un desequilibrio de fluidos y electrolitos, bacteremia y endotoxemia. Además de las respuestas de inflamación y estromales, las disfunciones endoteliales parecen ser factores importantes que contribuyen a la letalidad.

25 Tanto en el síndrome HP como GI, el daño tisular letal resulta de la apoptosis masiva dependiente de p53. Además, se ha mostrado que la pérdida de pelo dependiente de p53 (alopecia) ocurre como resultado de la quimioterapia o radiación experimental. Así, parece que p53 podría jugar un papel en la sensibilización de las células al estrés genotóxico.

30 Para examinar el papel de p53 en la muerte inducida por radiación, se trataron ratones con la molécula pequeña inhibidora de p53, pifitrina-alfa (PFT α) (Komarov et al., Science 285: 1733-7, 1999) inmediatamente antes de la irradiación gamma. Se inyectó a ratones C57B1/6J (se usaron ratones de 6-8 semanas de edad aquí y a continuación, si no se indica otra cosa) intraperitonealmente 10 mg/kg de PFT α y se irradiaron usando una fuente de ¹³⁷Cesio Shepherd 4.000 Ci a una velocidad de dosis de 4 Gy por minuto. PFT α protegió a los ratones de una única dosis de 9 Gy de radiación gamma o una dosis de radiación acumulativa fraccionada de 12, 5 Gy (5 x 2,5 Gy). Por el contrario, PFT α no tuvo efecto en la supervivencia de ratones tratados con dosis altas únicas, es decir, 12,5 ó 25 Gy, de IR (Fig. 1a).

35 Para examinar adicionalmente el papel de p53 en el síndrome GI, se expusieron ratones de tipo salvaje y deficientes en p53 a dosis bajas (10 Gy) y altas (15 Gy) de radiación gamma. Como se muestra en la Fig. 1b, los ratones deficientes en p53 fueron resistentes a dosis bajas de radiación que matan a través del síndrome HP, pero mucho más sensibles a dosis más altas de radiación que matan a través del síndrome GI. Las secciones de parafina teñidas con hematoxilina-eosina del intestino delgado de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 a las 0, 24, 48, 72 y 96 h después de una dosis de 15 Gy de radiación gamma se muestran en la Fig. 1d. Los ratones deficientes en p53 presentaron daño de células
40 epiteliales acelerado. La tinción TUNEL en las criptas (a las 24 h) reveló que la apoptosis era evidente en el epitelio de tipo salvaje pero no en el deficiente en p53. Para examinar esto adicionalmente, se expusieron los ratones de tipo salvaje a 11 Gy de irradiación de cuerpo entero y entonces, 12 h después, se les inyectaron $1,5 \times 10^7$ células de médula ósea de ratones de tipo salvaje o nulos para p53 singénicos C57B1/6J. (Esta dosis de radiación causó 100% de letalidad en los ratones control no reconstituidos). Dos meses más tarde, después de la recuperación completa de la hematopoyesis, los dos grupos de animales se trataron con 15 Gy de radiación gamma de cuerpo entero. Como se muestra en la Fig. 1c, no hubo ninguna diferencia en las proporciones de muerte entre los dos grupos de ratones que se
45 diferenciaban en el estado de p53 de su médula ósea (ambos tenían células intestinales de tipo salvaje).

50 Las dinámicas de la proliferación celular y supervivencia celular se examinaron adicionalmente en los intestinos delgados de ratones de tipo salvaje y nulos para p53. Se inyectó intraperitonealmente a ratones de tipo salvaje y nulos para p53 de cuatro semanas de edad ¹⁴C-timidina (10 μ Ci por animal) y entonces la mitad de cada grupo se expuso a 15 Gy de radiación gamma. Las autorradiografías de secciones de cuerpo completo revelaron que después de 24 h, las células en las criptas intestinales de los ratones deficientes en p53 continuaban proliferando, mientras que las de los ratones de tipo salvaje eran quiescentes (Fig. 2a, izquierda). Se trataron ratones de tipo salvaje y nulos para p53 de cuatro semanas de edad con 15 Gy de radiación gamma y 2 h antes de sacrificarlos se les inyectó BrdU (50 mg/kg) y los intestinos se

inmunotifieron. 24 h después de la irradiación, había muchas células que proliferaban en los ratones nulos para p53 pero pocas en los ratones de tipo salvaje. Por el contrario, a las 96 h, había pocas células que proliferaban en los ratones nulos para p53, mientras que los ratones de tipo salvaje presentaban más células marcadas.

5 Para caracterizar esto adicionalmente, se contó el número de células positivas para BrdU en los intestinos delgados de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 a diferentes puntos de tiempo después de 15 Gy de radiación gamma. Se analizaron tres animales para cada punto de tiempo, se prepararon cinco secciones transversales ilíacas de cada animal y se analizaron microscópicamente para estimar el número de criptas y vellosidades. Se contó el número de células positivas para BrdU en las criptas en cinco campos aleatorios con un aumento de 200x (100-300 criptas) y se representó el número medio de células positivas para BrdU (Fig. 2b). El número de células positivas para BrdU en los ratones nulos para p53 presentó un pico a las 10 h y después descendió, mientras que el número de células positivas para BrdU en los ratones de tipo salvaje descendió durante las primeras 20 h y entonces se incrementó. La localización de las células marcadas con BrdU se siguió en los intestinos delgados de ratones de tipo salvaje y nulos para p53 a diferentes puntos de tiempo después de 15 Gy de radiación gamma. Se inyectó BrdU 30 min antes de la irradiación y los ratones se sacrificaron a las 0, 48, 72 y 96 h. En los ratones nulos para p53, hubo una migración acelerada de células marcadas con BrdU desde las criptas a las vellosidades (comparar tipo salvaje y nulo para p53 a las 48 h), seguido de la eliminación rápida de las células marcadas en ratones nulos para p53 (Fig. 2c).

20 Así, la proliferación celular continua en las criptas del epitelio deficiente en p53 irradiado se correlaciona con la muerte acelerada de las células dañadas de la cripta y la destrucción rápida de las vellosidades. En los ratones de tipo salvaje, sin embargo, p53 prolonga la supervivencia induciendo la parada del crecimiento en las criptas del intestino delgado, preservando de esta manera la integridad del intestino. Así, la función proapoptótica de p53 promueve el síndrome hematopoyético, mientras que su función de parada del crecimiento retrasa el desarrollo del síndrome gastrointestinal. Así, la supresión farmacológica de p53 sería inútil (si no perjudicial) frente al síndrome GI. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias alternativas para la radioprotección del epitelio del intestino delgado que se basarán en otro mecanismo, tal como, por ejemplo, la activación de NF- κ B e inhibición posterior de la muerte celular.

25 Ejemplo 2

Lipopéptidos retrasan la muerte de ratones causada por irradiación gamma de cuerpo entero

30 Los lipopéptidos son activadores potentes de NF- κ B y, como tales, pueden actuar como inhibidores de la muerte apoptótica. Para determinar si los lipopéptidos funcionan como radioprotectores, varios lipopéptidos se ensayaron inicialmente para determinar la dosis máxima tolerable (MTD). Varios lipopéptidos se ensayaron entonces para medir su efecto protector en ratones NIH Swiss frente a síndromes letales hematopoyéticos y/o gastrointestinales después de exposición a 10 Gy ó 13-15 Gy de radiación gamma de cuerpo entero, respectivamente. Los lipopéptidos (0,3-10 μ g/ratón) se administraron subcutáneamente 30 minutos antes de la irradiación. Los lipopéptidos ensayados que proporcionaron radioprotección se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Secuencia del Péptido	SEQ ID NO	Longitud del Péptido	N-acilación
SKKKK	8	5	R-Pam2
SKKKK	8	5	R-Pam3
FEPPPATTT	22	9	Pam2
GNNDESNISFKEK	31	13	Pam2
GDPKHPKSF	24	9	Pam2
GETDKEGKIIRIFDNSF	37	17	Pam2

35 Los resultados de un experimento representativo usando R-PAM₂C-SKKKK (SEQ ID NO: 8) (de aquí en adelante, este compuesto se denomina, CBLB601) a <0,1 MTD se muestran en la Fig. 3. Como se esperaba, los ratones control irradiados con 10 Gy murieron entre 11 y 15 días después del tratamiento, mientras que todos los animales que recibieron CBLB601 vivieron más allá de 35 días después del tratamiento. De manera similar, los ratones control irradiados con 13 Gy murieron entre 6 y 10 días después del tratamiento, mientras que todos menos un animal que recibieron CBLB601 vivió más allá de 35 días después del tratamiento. La capacidad radioprotectora de CBLB601 se

analizó adicionalmente midiendo el efecto de la radiación en el tamaño del bazo. Como se muestra en la Fig. 4, los ratones tratados con CBLB601 mostraron una reducción significativamente menor en el tamaño del bazo. CBLB601 también protegió el timo de la radiación (datos no mostrados). La capacidad de CBLB601 de proteger eficazmente los esplenocitos, apoyar la recuperación rápida del timo y proteger el tracto GI del daño por radiación indica que los lipopéptidos pueden usarse como radioprotectores.

Ejemplo 3

Eficacia radioprotectora de una única dosis de CBLB601 frente a irradiación gamma de cuerpo entero

CBLB601, un lipopéptido R-Pam₂ con el resto peptídico que consiste en C-SK KKK (SEQ ID NO: 8), se seleccionó para una caracterización más detallada como un radioprotector tomando como base su capacidad de activar NF-κB y los datos preliminares in vivo sobre radioprotección en ratones NIH-SWISS (véase el Ejemplo 2). Los objetivos de este estudio fueron determinar la dosis, ruta de administración y tiempo de administración óptimos de CBLB601 para funcionar como un protector. Se usaron ratones hembra ICR de 10-15 semanas de edad, con 10-15 animales por grupo o afección.

La dosis de NOAEL (nivel sin efectos adversos obvios) se determinó inyectando intraperitonealmente (i.p) a ratones ICR dosis crecientes de CBLB601 (0,3, 1, 3, 10, 30, 60, 100 µg/ratón). A los ratones control se les inyectó PBS. Los ratones se observaron durante dos semanas. Durante la primera semana se pesaron diariamente. No hubo diferencias en el peso entre los ratones tratados con CBLB601 y control. Se observó mortalidad 1-2 días después del tratamiento a 100 µg de CBLB601/ratón, pero no a ninguna de las dosis menores. Sin embargo, a la dosis 60 µg, los ratones mostraron signos de morbilidad, tales como movimiento lento y pelo desaliñado, alrededor de 3-4 días después del tratamiento. A la dosis 30 µg, no hubo diferencias notorias entre los ratones tratados y control. Así, se determinó que NOAEL para CBLB601 era 30 µg/ratón.

El esquema óptimo de administración intraperitoneal de CBLB601 se determinó inyectando el compuesto a diferentes tiempos antes de la irradiación. Previamente, se encontró que CBLB601 era protector frente a 10 Gy pero no a dosis de irradiación mayores (véase el Ejemplo 2). Por lo tanto, todos los experimentos de optimización se realizaron con 10 Gy de irradiación de cuerpo entero (TBI). Se eligió una dosis de 3 µg de CBLB601/ratón (1/10 NOAEL) como la dosis de partida. Así, se inyectaron 3 µg de CBLB601 i.p. a ratones ICR a 0,5h, 1h, 6h y 24h ó 1h, 24h, 48h, 72h, 96h antes de 10Gy de TBI (como se ha descrito en el Ejemplo 1). Después de la irradiación, los ratones se observaron durante 30 días y se registró su supervivencia. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Fig. 5. La inyección de CBLB601 24 h antes de la irradiación rindió claramente la mejor radioprotección (90-100% de supervivencia a los 30 días). Cuando el compuesto se administró 48 h antes de la irradiación, la radioprotección fue ~30%. La administración de CBLB601 1h antes de la irradiación produjo resultados inconsistentes que variaron de 80% de protección en un experimento (Fig. 5B) a casi no protección (20%) en otro experimento (Fig. 5A). No se observó radioprotección cuando el fármaco se administró 0,5h (10%), 6h (20%), 72h y 96h antes de TBI.

Para determinar la dosis radioprotectora óptima de CBLB601, el momento de la inyección y el nivel de irradiación se mantuvieron constantes, mientras que se varió la dosis de CBLB601. Se inyectó a los ratones ICR i.p. 1, 3, 10, 20 ó 30 µg de CBLB601/ratón ó 0,1, 0,3, 1, 3, 10 ó 15 de CBLB601/ratón 24 antes de la irradiación (10 Gy de TBI) y su supervivencia se monitorizó durante 30 días. La dosis más protectora fue 3 µg/ratón, que sustentó una supervivencia de 100% (Fig. 6 A y B). Se alcanzó una eficacia casi similar con las dosis 1 y 10 µg/ratón, que rescataron 90% de los ratones (en un experimento). Por el contrario, las dosis más altas de CBLB601 (20 y 30 µg/ratón) dieron lugar a mortalidad acelerada cuando se administraron en combinación con irradiación, comparado con los ratones control a los que se inyectó PBS. Algunos signos de esta toxicidad combinada fueron detectables ya a la dosis de 10 µg/ratón. Así, se determinó que la dosis protectora óptima de CBLB601 era 3 µg/ratón. Así, aunque parece que CBLB601 confería radioprotección a dosis 10-30 veces más bajas que el NOAEL, los márgenes de seguridad de CBLB601 se redujeron significativamente cuando CBLB601 se administró en combinación con irradiación.

Para determinar el nivel de radiación que estaba protegido por CBLB601, se expusieron ratones tratados con radioprotector y control a niveles crecientes de TBI. Se inyectaron a los grupos de ratones ICR i.p. bien 3 µg de CBLB601/ratón o PBS, y entonces 24 después recibieron dosis de 10, 11, 12, 13, 14 y 15 Gy de TBI. La supervivencia se registró durante 30 días. La Fig. 7A muestra la mortalidad dependiente de la dosis de radiación de ratones a los que se inyectó PBS. Todos los ratones irradiados con 10-11 Gy de TBI murieron entre los días 12-14 después de la irradiación, que era típico de muerte debida a fallo hematopoyético. Todos los ratones que recibieron 14-15 Gy de TBI murieron entre los días 7-9 después de la irradiación, que era típico de mortalidad debida a daño intestinal inducido por radiación. Los ratones que se irradiaron con 12-13 Gy de TBI murieron en tiempos intermedios, que era típico de una etiología mixta de mortalidad inducida por radiación. La Fig. 7B muestra la mortalidad dependiente de la dosis de radiación de ratones pretratados con CBLB601. Los ratones a los que se inyectaron 3 µg de CBLB601 24 h antes de la

irradiación estuvieron, como se esperaba, totalmente protegidos frente a 10 Gy de TBI. A pesar de las diferencias obvias en la supervivencia entre los ratones control y tratados, los efectos protectores de CBLB601 no alcanzaron una significancia estadística en este marco. Para alcanzar una diferencia estadísticamente significativa del 10% entre los ratones control y tratados con CBLB601, deben usarse grupos experimentales de al menos 50 ratones. Aunque CBLB601 rescató al 100% de los ratones frente a 10 Gy de TBI, su protección a 11 Gy de TBI sólo fue del 20%. No hubo protección frente a la irradiación a niveles mayores de 11 Gy, lo que indica que CBLB601 fue incapaz de rescatar a los animales del componente gastrointestinal de radiotoxicidad. Además, a dosis de irradiación de 11, 12 y 13 Gy, los ratones tratados con CBLB601 murieron con cinética acelerada, es decir, similar a los que recibieron dosis de 14-15 Gy, comparado con los ratones control a los que se inyectó PBS. Esto puede ser indicativo de una toxicidad combinada del fármaco y la irradiación. Así, parece que a niveles mayores de irradiación, CBLB601 no confiere protección y que también era más tóxico,

CBLB601 se administró intramuscularmente para determinar la ruta óptima de administración de este compuesto (especialmente porque ésta sería la ruta preferida de administración para los seres humanos). La Fig. 8 muestra las proporciones de supervivencia de ratones a los que se inyectó intramuscularmente (i.m.) 1, 3 ó 10 μg de CBLB601/ratón 24 h antes de la irradiación. Las tres dosis de CBLB601 confirieron radioprotección y no hubo ningún signo de toxicidad combinada a la dosis 10 μg /ratón i.m. como hubo para la dosis 10 μg /ratón i.p. (Fig. 6). En otro experimento, se ensayaron dosis crecientes de CBLB601 administradas i.m. frente a dosis 10, 11 y 12 Gy de TBI (Fig. 9). Hubo un desplazamiento no estadísticamente significativo hacia mortalidad incrementada de los ratones a los que se inyectaron las dosis más altas (10, 30 μg) de CBLB601 antes de la exposición a 10 Gy de TBI. Un resumen de la dependencia de la dosis de la radioprotección de CBLB601 administrado i.p. o i.m. 24 h antes de 10 Gy de TBI se muestra en la Fig. 10. A partir de estos datos, se concluyó que la ruta i.m. de administración era tan eficaz como la ruta i.p. y la dosis óptima (3 μg /ratón) era la misma para ambas rutas de administración. Además, se concluyó que la administración i.m. puede ser más segura porque tuvo un índice terapéutico (dosis tóxica/dosis eficaz) mayor: 10-30 para administración i.m. (Figs. 8 y 9: 30 μg /ratón/1-2 μg /ratón) frente a 3-10 para la administración i.p. (Fig. 6: 10 μg /ratón/1-3 μg /ratón). Además, el recálculo de la dosis eficaz por peso corporal reveló una ventana menor para la administración intraperitoneal comparado con la administración intramuscular; es decir, 90-110 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para administración i.p. y 60-115 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para administración i.m. (Fig. 11).

El esquema óptimo de administración intramuscular de CBLB601 se determinó variando el tiempo entre la administración del fármaco y la irradiación. Se inyectaron i.m. a ratones ICR 3 μg de CBLB601/ratón 24h, 6h, 3h y 1h antes de TBI y +1h, +3h después de TBI (Fig. 12A), así como 48h, 36h, 24h, 12h y 6h antes de TBI (Fig. 12B). Estos experimentos revelaron que, de manera similar a la ruta intraperitoneal de administración, el tiempo óptimo para la administración intramuscular de CBLB601 fue 24h antes de 10 Gy de TBI. La administración intramuscular de 3 μg de CBLB601/ratón después (1h y 3h) de 10 Gy de TBI no tuvo ningún efecto protector (Fig. 12A). Además, las dosis más altas de CBLB601 (10 y 30 μg /ratón) inyectadas i.m. 1h después de 10 Gy de TBI causaron niveles incrementados de toxicidad combinada (Fig. 13C). Estos datos se resumen en la Fig. 13.

Para determinar DMF (factor modificador de dosis), se inyectaron 3 μg de CBLB601/ratón i.m. 24h antes de la irradiación y a los ratones control se les inyectó PBS. Ambos grupos inyectados con fármaco y control recibieron una única dosis de TBI que cubría el intervalo de dosis que da lugar a 10-90% de mortalidad en los intervalos de tiempo elegidos (7 días para la mortalidad por síndrome gastrointestinal y 30 días para la mortalidad por síndrome hematopoyético). Se construyeron gráficos de porcentaje de mortalidad-dosis de radiación y se calcularon $DL_{50/7}$ y $DL_{50/30}$ (DL_{50} a los 7 días y 30 días, respectivamente) usando análisis estadísticos probit o logit. DMF (también conocido como factor reductor de la dosis, DRF) se calculó como una proporción de DL_{50} de radiación para los grupos tratados con CBLB601 y DL_{50} de radiación para los grupos tratados con vehículo de ratones para el punto de tiempo de supervivencia elegido, 7 ó 30 días. Para calcular DMF_{30} , que es el DMF en el día 30 después de la irradiación, se determinaron los valores de $DL_{50/30}$ de radiación para ratones tratados con PBS ó 3 μg de CBLB601. Para esto, los grupos a los que se inyectó PBS se irradiaron con dosis de 6, 6,5, 7 y 7,7 Gy de TBI y los grupos a los que se inyectó CBLB601 se irradiaron con dosis de 10, 10,5, 11, 11,5 y 12 Gy de TBI. La $DL_{50/30}$ para CBLB601 se calculó usando análisis ProBit y se estimó que estaba en el intervalo de 11,07-11,61 Gy, con la media de ~ 11.32 Gy (véase la Fig. 14). Sin embargo, la inconsistencia en la respuesta a algunas dosis de radiación (7 Gy aparecía como no tóxica mientras que 6,5 Gy causó 60% de letalidad a los 30 días) en los ratones control evitó un cálculo exacto del DMF_{30} para CBLB601. No obstante, se esperaba que la $DL_{50/30}$ para los ratones ICR fuera alrededor de 7 Gy [una media para la mayoría de las cepas de ratones; Monobe et al. *Radiother Oncology* 73 Supl 2: S12709, 2004)]. Así, el valor de DMF_{30} para CBLB601 se estimó aproximadamente como $\sim 1,6$.

55

Ejemplo 4**Estado inmune de los ratones rescatados de las dosis letales de TBI por CBLB601**

Los ratones que han sido rescatados de 10 Gy de TBI por la administración de CBLB601 pueden tener sistemas inmunes comprometidos y, por lo tanto, pueden no tener vidas "normales". Para comprobar el estado de sus sistemas inmunes, se expusieron ratones ICR a dosis letales (10 Gy) o no letales (6 Gy) de TBI 24 h después de haberles inyectado (i.m.) 3 µg CBLB601/ratón o PBS. Se sacrificaron grupos de cinco ratones de cada condición cada tres días y sus bazos y timos se extrajeron y pesaron. Los pesos de los bazos se normalizaron respecto a los pesos corporales de los animales correspondientes y los resultados se presentan en la Fig. 15. Los ratones tratados con PBS que se expusieron a 6 Gy de radiación tardaron aproximadamente 13-14 días en restaurar sus bazos a los pesos normales, mientras que los ratones tratados con CBLB601 expuestos a 6 Gy de radiación tenían pesos normales del bazo sobre el día 8. Los animales a los que se inyectó PBS no sobrevivieron a 10 Gy de TBI, mientras que los ratones a los que se inyectó CBLB601 no sólo sobrevivieron a la dosis letal de radiación, sino que también restauraron completamente sus pesos del bazo sobre el día 13-14 después de la irradiación. Se tardó un periodo más largo de tiempo (~30 días) en restaurar los timos a pesos normales (no mostrado).

Los bazos y timos de los ratones control y a los que se había inyectado CBLB601 se examinaron microscópicamente para cambios morfológicos a los 3, 10 y 30 días después de la irradiación. A los 3 días después de la irradiación, el bazo y timo de ratones irradiados en cuerpo completo control y tratados con CBLB601 revelaron lesiones inducidas por la irradiación, incluyendo depleción linfocítica moderadamente severa o severa del bazo y el timo y atrofia severa de la pulpa roja del bazo. A los 10 días después de la irradiación, los animales tratados con CBLB601 mostraron una mejora sobre los animales control en la recuperación de la atrofia de la pulpa roja esplénica; todos los animales tratados con CBLB601 mostraron hematopoyesis extramedular multifocal (EMH) suave a moderada mientras que ninguno de los controles presentó EMH. No hubo evidencia de recuperación de la depleción de la pulpa blanca esplénica en ningún grupo en el día 10. La hiperplasia linfocítica regenerativa en el timo fue evidente en ambos grupos en el día 10, con la regeneración ligeramente más avanzada en el control que en los ratones tratados con CBLB601. Sobre el día 30 después de la irradiación, todos los animales tenían pulpa roja esplénica normal, la mayor parte de los animales mostraron recuperación completa o casi completa de elementos linfocíticos y todos tenían timos esencialmente normales.

Para ensayar la respuesta inmune de los ratones rescatados de una dosis letal de irradiación gamma (10 Gy de TBI) por CBLB601, varios grupos de dichos ratones se sometieron a inmunización con un antígeno fuerte, flagelina de Salmonella. Los ratones se inmunizaron en primer lugar a las 8, 18 ó 20 semanas después de la irradiación, momento en el cual tenían 18, 25 y 33 semanas de edad, respectivamente. Se usaron ratones no irradiados sin estimular de 29 semanas de edad como un control positivo para la respuesta inmune. Los ratones recibieron un refuerzo de flagelina una semana después de la primera inmunización y otro refuerzo tres semanas después del 2º refuerzo; se midieron las titulaciones del anticuerpo anti-flagelina en el suero de los ratones. Para ensayar la respuesta inmune secundaria, los ratones se sangraron de nuevo un mes después para asegurar la reducción de las titulaciones de anticuerpo. Esto se siguió por un 3º refuerzo de la inyección de antígeno y la medida de las titulaciones de anticuerpos anti-flagelina 10 días después. En el momento del 3º refuerzo, los ratones irradiados tenían 38, 30 y 23 semanas de edad y los ratones control tenían 34 semanas de edad.

La respuesta inmune un mes después de la primera inmunización (tres semanas después del primer refuerzo) se muestra en la Fig. 16A. Los ratones irradiados tratados con CBLB601 generaron una respuesta inmune humoral robusta frente a la flagelina que fue indistinguible de la de los ratones control sin estimular. También resultó que el nivel de respuesta inmune no era dependiente del tiempo que había pasado después de la irradiación, ya que todos los grupos presentaron una buena respuesta. Aunque había alguna variación individual en el grupo de 20 semanas después de la irradiación, se sabe bien que la respuesta inmune puede estar alterada en los animales más viejos. Se comprobaron de nuevo las titulaciones de anticuerpo un mes después del primer sangrado, y todavía estaban elevadas siete semanas después de la inmunización (Fig. 16B). La respuesta inmune secundaria (Fig. 16C) fue más fuerte que la primera respuesta (Fig. 16A). Estos datos indican encarecidamente que CBLB601 no sólo rescató a los ratones de TBI letal, sino que también permitió una restauración completa de un sistema inmune funcional.

Ejemplo 5**Activación de NF-κB y radioprotección proporcionada por otros lipopéptidos**

Se sintetizaron lipopéptidos adicionales y se ensayaron para activación de NF-κB y su capacidad de proteger a ratones de dosis letales de radiación. Los nombres de los compuestos y sus constituyentes clave se muestran en la Tabla 4. Para algunos de los compuestos, también se sintetizaron y ensayaron los péptidos libres correspondientes.

Tabla 4

Nombre del compuesto	N-acilación	Secuencia del péptido	SEQ ID NO
CBLB602	Pam2	GQH HH	12
CBLB603	Pam2	GQH HM	11
CBLB604	Pam2	GSH HM	14
CBLB605	Pam2	SQM HH	15
CBLB606	R-Pam2	GDPKHPKSF	24
CBLB607	Pam2	GDPKHPKSFTGWVA	32
CBLB608	Pam2	FEPPPATTTKSK	30
CBLB611	Pam2	GETDKEGKIIRIFDNSF	37
CBLB612	R-Pam2	VQGEESNDK	21
CBLB613	R-Pam2	GETDK	16
CBLB614	R-Pam2	QGEESNDK	20
CBLB615	R-Pam2	GEESN	17
CBLB616	R-Pam2	TENVKE	19
CBLB617	R-Pam2	GEEDD	18

La actividad informadora dependiente de NF- κ B se midió en células 293 que expresaban el heterodímero TLR2/TLR6. La activación in vitro de NF- κ B por CBLB613 fue comparable a la de CBLB601 (Fig. 17). Los compuestos CBLB614 y CBLB615 tienen derivados sucesivamente más cortos del péptido de CBLB612 (véase la Tabla 4). Los tres compuestos activaron el informador NF- κ B y todos fueron mejores activadores que CBLB601 (Fig. 18A, B). Ninguno de los péptidos no palmitoilados correspondientes activó el informador NF- κ B (Fig. 18B). El componente peptídico de CBLB617 tiene una carga (-4), que debería evitar que interaccionara con marcadores de la superficie celular cargados negativamente. La activación de NF- κ B de CBLB617 fue comparable a la de CBLB601 (Fig. 19). La Tabla 5 resume la actividad in vitro y la solubilidad de todos los compuestos.

Tabla 5

Compuesto	Solubilidad	Activación de NF- κ B
CBLB601	Excelente	100
CBLB602	Pobre	0
CBLB603	Pobre	0
CBLB604	Pobre	0
CBLB605	Pobre	2
CBLB606	Pobre	100
CBLB607	Pobre	2
CBLB608	Excelente	2
CBLB61	Insoluble	0

Compuesto	Solubilidad	Activación de NF-κB
CBLB612	Excelente	200
CBLB613	Soluble	200
CBLB614	Soluble	200
CBLB615	Soluble	200
CBLB616	No ensayado	No ensayado
CBLB617	Soluble	100

5 También se ensayó la actividad radioprotectora in vitro de algunos de los compuestos. Se inyectaron intramuscularmente a ratones ICR varias dosis de los compuestos de ensayo y 24 horas después los ratones se expusieron a 10 Gy de TBI. Se monitorizó la supervivencia durante 30 días. La Fig. 20 muestra la actividad protectora de CBLB613. Dosis de 10, 30 y 82,5 µg de CBLB613/ratón proporcionaron 100% de protección y no fueron tóxicas en combinación con la radiación (a diferencia de CBLB601). Los compuestos relacionados CBLB612, CBLB614 y CBLB615 se ensayaron para actividad radioprotectora frente a 10 Gy de TBI. Se inyectaron dosis de 1, 3, 10 y 30 µg/ratón (CBLB612 también se ensayó a 60 µg/ratón) i.m. en ratones ICR 24 h antes de la irradiación. Como se muestra en la Fig. 21, los tres compuestos proporcionaron 90-100% de radioprotección cuando se administraron a las dosis más altas. La radioprotección fue claramente dependiente de la dosis, sin toxicidad en combinación con la radiación. La potencia de los compuestos es CBLB612 > CBLB614 > CBLB615. La actividad radioprotectora de CBLB617 está actualmente bajo evaluación usando el procedimiento estándar. Después de 13 días, no había toxicidad visible a la dosis más alta (87,5 µg/ratón), mientras que había 7-90% de supervivencia a dosis de 10-87,5 µg/ratón, respectivamente. En resumen, CBLB612 y CBLB613 son radioprotectores significativamente mejores que CBLB601 y tienen unos índices terapéuticos más altos ~20 para CBLB612 y CBLB613 frente 3 para CBLB601).

20 También se examinó la capacidad de CBLB612 de funcionar como un mitigador de daño por dosis más bajas de radiación. Para esto, se inyectaron 50 µg de CBLB612/ratón intramuscularmente 1 h después de la exposición a 8,5, 9 ó 10 Gy de TBI. El tratamiento con CBLB612 incrementó la proporción de supervivencia a todas las dosis de radiación (Fig. 22). Por ejemplo, a 8,5 Gy, 90% de los ratones tratados con CBLB612 y 50% de los tratados con PBS sobrevivió hasta 27 días (p=0,03) y, a 9 Gy, 70% de los ratones tratados con CBLB612 y 50% de los tratados con PBS sobrevivió hasta 27 días (p=0,0006). No se observó ninguna diferencia entre los grupos tratados con CBLB612 y control a dosis más bajas de radiación debido a la baja supervivencia de los ratones control (no mostrado). Estos datos indican que CBLB612 puede funcionar como un mitigador de la radiación, así como un radioprotector.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cleveland Biolabs, Inc. Shakhov, Alexander N. Gudkov, Andrei

5 <120> Métodos para proteger frente a apoptosis usando lipopéptidos.

<130> 050991-110422

10 <150> 60/689.810
<151> 13-06-2005

<160> 52

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

25 <400> 1

Ser Asn Asn Ala
1

30 <210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 2

Gly Ser Ser His His
1 5

40 <210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 3

50 Lys Gln Asn Val Ser
1 5

55 <210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 4
 5 Asn Asn Ser Gl̄y Lys
 1 5
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 15 <400> 5
 Gl̄n Pro Asp Arg Tyr
 1 5
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 6
 Arg Pro Asp Arg Tyr
 1 5
 30 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 7
 40 Ser Gl̄u Gl̄u Gl̄u Gl̄u
 1 5
 <210> 8
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 50 <400> 8
 Ser Lys Lys Lys Lys
 1 5
 55 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

5 <400> 9

Ser Asn Asn Asn Ala
1 5

10 <210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 10

Ser Pro Pro Pro Pro
1 5

20 <210> 11
<211> 5
<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

30 <400> 11

Gly Gln His His Met
1 5

35 <210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

40 <400> 12

Gly Gln His His His
1 5

45 <210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 13

55 Ser Ser His His Met
1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 14
10
Gly Ser His His Met
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
15
<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO
20
<400> 15

Ser Gln Met His His
1 5
25
<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
30
<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 16
35
Gly Glu Thr Asp Lys
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
40
<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO
45
<400> 17

Gly Glu Glu Ser Asn
1 5
50
<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial
55
<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 18

Gly Glu Glu Asp Asp
 1 5

5 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 19

Thr Glu Asn Val Lys Glu
 1 5

15 <210> 20
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 20

25 Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys
 1 5

30 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

35 <400> 21

Val Gln Gly Glu Glu Ser Asn Asp Lys
 1 5

40 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 22

Phe Glu Pro Pro Pro Ala Thr Thr Thr
 1 5

50 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 23

5 Gly Asp Lys Tyr Phe Lys Glu Thr Glu
1 5

<210> 24

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

15 <400> 24

Gly Asp Pro Lys His Pro Lys Ser Phe
1 5

<210> 25

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 25

Gly Gly Gln Glu Lys Ser Ala Ala Gly
1 5

<210> 26

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 26

40 <210> 27

Gly Pro Cys Pro Gly Cys Pro Pro Cys
1 5

<211> 9

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

50 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 27

Pro Pro Cys Pro Gly Cys Pro Pro Cys
1 5

55 <210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

5 <400> 28

Asp Asn Glu Glu Lys Pro Thr Pro Glu Gln Asp
1 5 10

10 <210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 29

Gly Asn Gly Gly Ala Pro Ala Gln Pro Lys Gly
1 5 10

20 <210> 30
<211> 12
<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

30 <400> 30

Phe Glu Pro Pro Pro Ala Thr Thr Thr Lys Ser Lys
1 5 10

35 <210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

40 <400> 31

Gly Asn Asn Asp Glu Ser Asn Ile Ser Phe Lys Glu Lys
1 5 10

45 <210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 32

55 Gly Asp Pro Lys His Pro Lys Ser Phe Thr Gly Trp Val Ala
1 5 10

ES 2 421 447 T3

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 33
 10
 Ala Gln Asn Pro Asn Lys Thr Asn Ser Asn Leu Asp Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 20
 <400> 34
 Asn Lys Asp Asn Glu Ala Glu Pro Val Thr Glu Gly Asn Ala Thr
 1 5 10 15
 25
 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 35
 35
 Ser Lys Glu Gly Asn Gly Pro Asp Pro Asp Asn Ala Ala Lys Ser
 1 5 10 15
 <210> 36
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 45
 <400> 36
 Gly Asp Lys Thr Pro Ser Thr Lys Ser Ala Gly Lys Val Glu Asn Lys
 1 5 10 15
 50
 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> PÉPTIDO SINTÉTICO
 <400> 37

ES 2 421 447 T3

Gly Glu Thr Asp Lys Glu Gly Lys Ile Ile Arg Ile Phe Asp Asn Ser
1 5 10 15

Phe

5 <210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 38

Ser Ser Thr Ser Glu Asn Asn Gly Asn Gly Asn Gly Asn Gly Gly Thr
1 5 10 15

Asp

15 <210> 39
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 39

25 Gly Asn Asn Asp Glu Ser Asn Ile Ser Phe Lys Glu Lys Ser Glu Glu
1 5 10 15

Glu Glu

30 <210> 40
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 40

Gly Asn Asn Asp Glu Ser Asn Ile Ser Phe Lys Glu Lys Ser Lys Lys
1 5 10 15

Lys Lys

40 <210> 41
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 41

ES 2 421 447 T3

Gly Asn Asn Asp Glu Ser Asn Ile Ser Phe Lys Glu Lys Ser Pro Pro
1 5 10 15

Pro Pro

5 <210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 42

Ser Ser Asn Lys Ser Thr Thr Gly Ser Gly Glu Thr Thr Thr Ala Ala
1 5 10 15

Gly Thr

15 <210> 43
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 43

25 Cys Gly Asn Asn Asp Glu Ser Asn Ile Ser Phe Lys Glu Lys Ser Lys
1 5 10 15

Lys Lys Lys

30 <210> 44
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 44

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

Asn Ser Ser

40 <210> 45
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 45

ES 2 421 447 T3

Ser Asn Tyr Ala Lys Lys Val Val Lys Gln Lys Asn His Val Tyr Thr
1 5 10 15

Pro Val Tyr

5 <210> 46
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 46

Ala Asp Val Ile Ala Lys Ile Val Glu Ile Val Lys Gly Leu Ile Asp
1 5 10 15

Gln Phe Thr Gln Lys
20

15 <210> 47
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 47

25 Gly Ala Ala Ser Ser Leu Thr Tyr Glu Ser Ser Val Gln Leu Val Val
1 5 10 15

Ser Asp Asn Ser Ser
20

30 <210> 48
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 48

Gly Gly Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Ala Glu Thr Pro Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Glu Ala Ala Ser
20

40 <210> 49
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>

ES 2 421 447 T3

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 49

5 Gly Gln Thr Asp Asn Asn Ser Ser Gln Ser Gln Gln Pro Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Thr Asn Thr
20

<210> 50

<211> 22

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

15

<400> 50

Ser Gly Ala Leu Ala Ala Thr Ser Asp Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala
1 5 10 15

Thr Val Ala Ile Val Ala
20

20 <210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 51

Ser Ile Val Ser Thr Ile Ile Glu Val Val Lys Thr Ile Val Asp Ile
1 5 10 15

30 Val Lys Lys Phe Lys Lys
20

<210> 52

<211> 22

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> PÉPTIDO SINTÉTICO

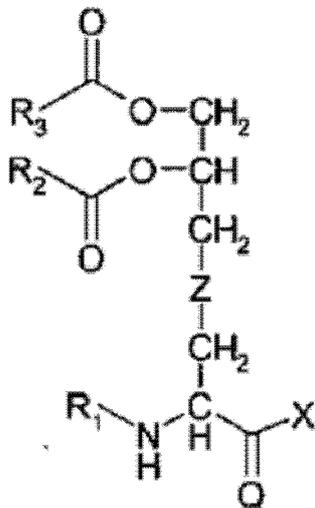
40 <400> 52

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Val Ala Ala Asp Ile Gly Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Asp Ala Leu Thr Ala Pro
20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula:



en la que,

- 5 R₁ representa H o -CO-R₄,
 R₂, R₃ y R₄ son independientemente H o alifático C₆-C₂₀ sustituido opcionalmente;
 X es un péptido que comprende SEQ ID NO: 21; y
 Z es S o CH₂.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1 para uso en un método para proteger a un mamífero de los efectos de uno o más tratamientos o afecciones que desencadenan la apoptosis.
3. La composición según la reivindicación 1 o uso de la reivindicación 2, en la que la afección se selecciona del grupo que consiste en radiación, lesión, envenenamiento, infección y choque térmico.
4. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 3, en la que la afección es radiación.
- 15 5. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 2, en la que el tratamiento es un tratamiento del cáncer.
6. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 5, en la que dicho tratamiento es quimioterapia o terapia con radiación.
7. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 2, en la que R₁ es H y R₂ y R₃ son alifáticos C₁₆ o sustituciones de éstos.
- 20 8. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 2, en la que el compuesto es un estereoisómero RR o RS o mezcla de éstos.
9. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 4, en la que la composición es para administración en combinación con un radioprotector.
- 25 10. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 9, en la que el radioprotector es un antioxidante.
11. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 10, en la que el antioxidante se selecciona del grupo que consiste en amifostina y vitamina E.
12. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 9, en la que el radioprotector es una citoquina.

13. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 12, en la que la citoquina es factor de células madre.
14. La composición o uso de la reivindicación 9, en la que el radioprotector es flagelina.
15. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 9, en la que el radioprotector es TGF β latente.
- 5 16. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 9, en la que el radioprotector es un activador de un TLR.
- 10 17. La composición según la reivindicación 1 para uso de la reivindicación 2, en la que la apoptosis se desencadena en un tejido seleccionado del grupo que consiste en el bazo, timo, tracto GI, pulmones, riñones, hígado, sistema cardiovascular, endotelio de los vasos sanguíneos, sistema neural central y periférico, células progenitoras hematopoyéticas (médula ósea), sistema inmune, folículos pilosos y sistema reproductor.

Figura 1a

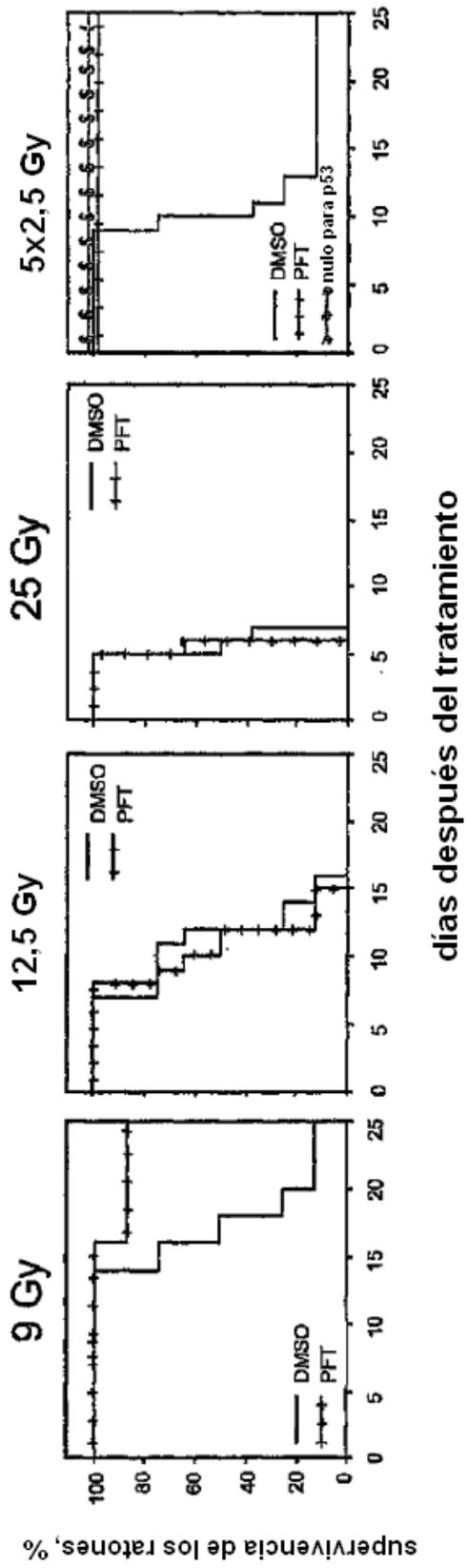


Figura 1b

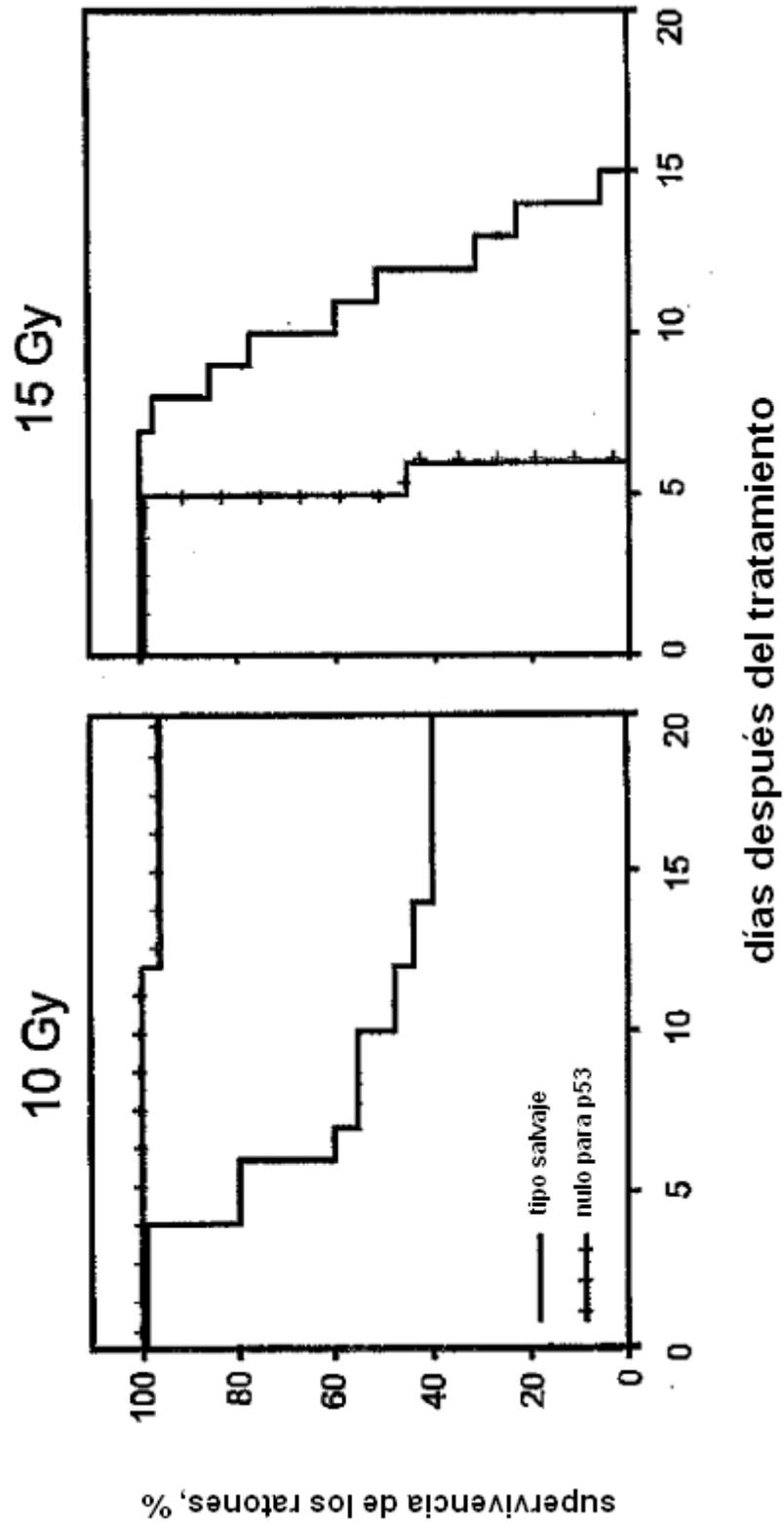


Figura 1c

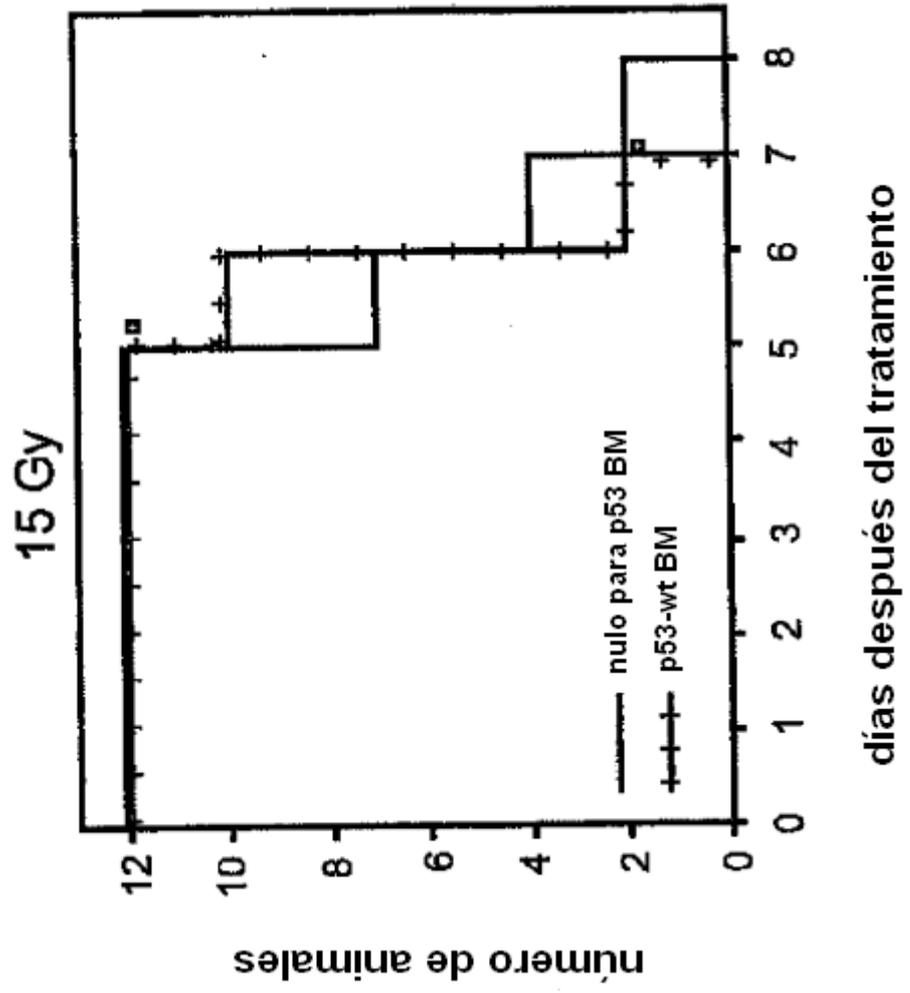


Figura 1d

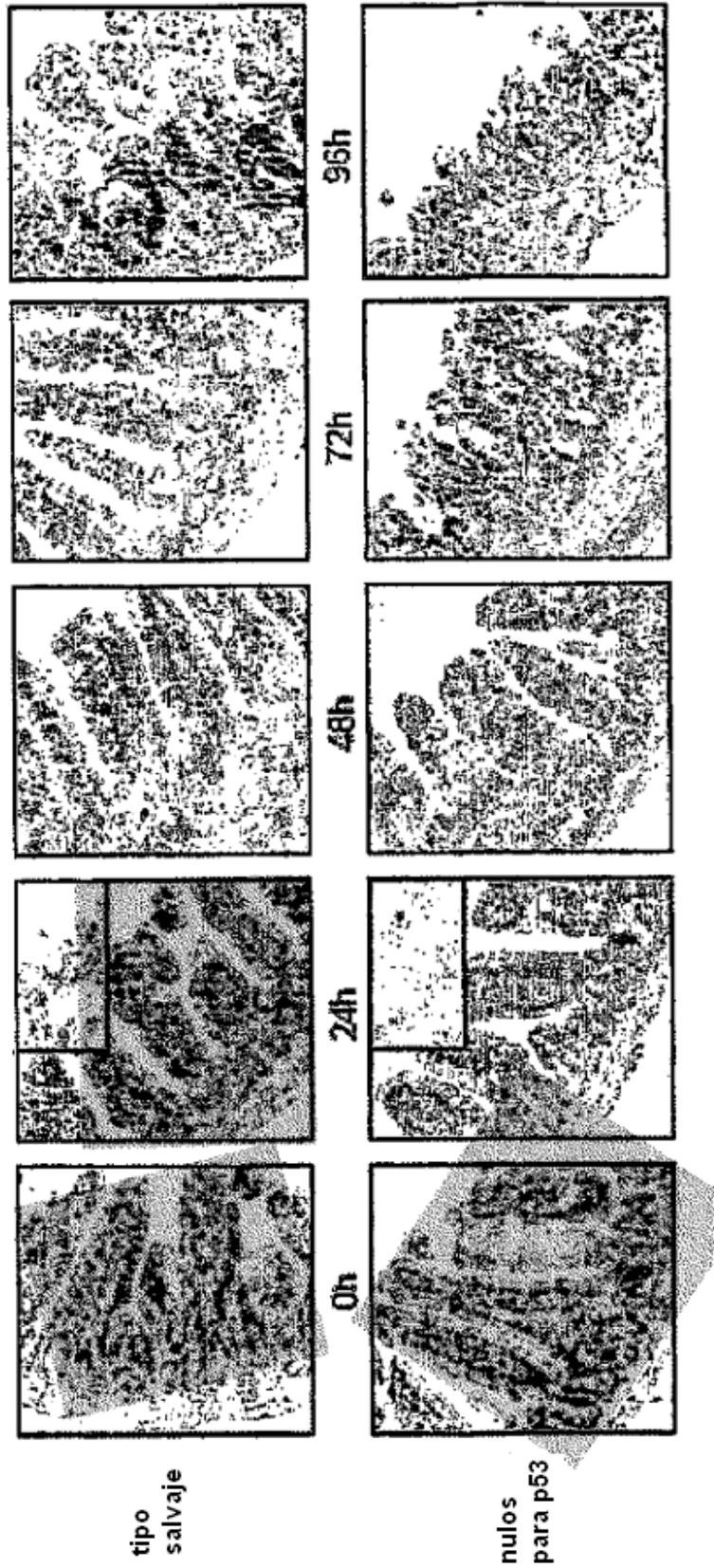


Figura 2a

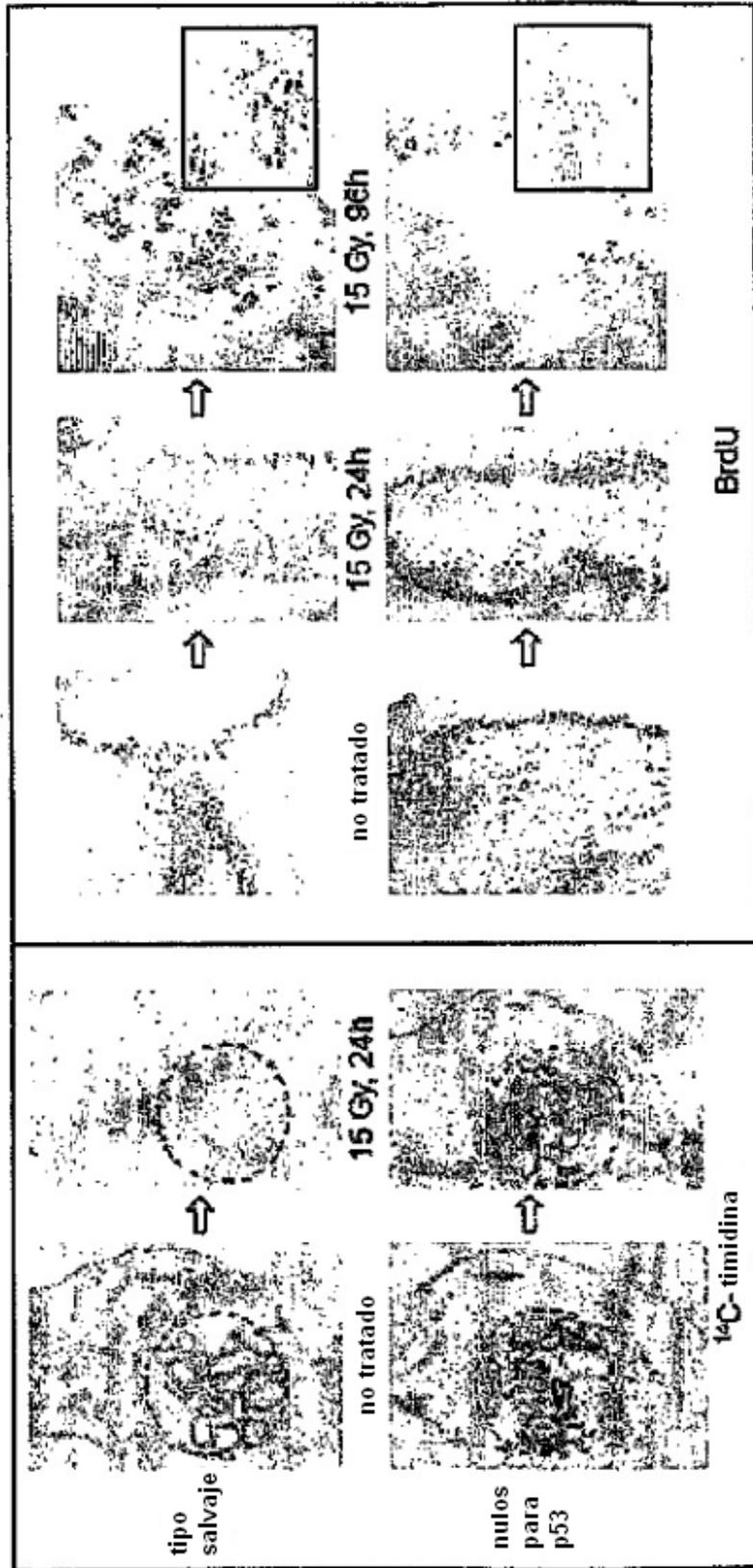


Figura 2b

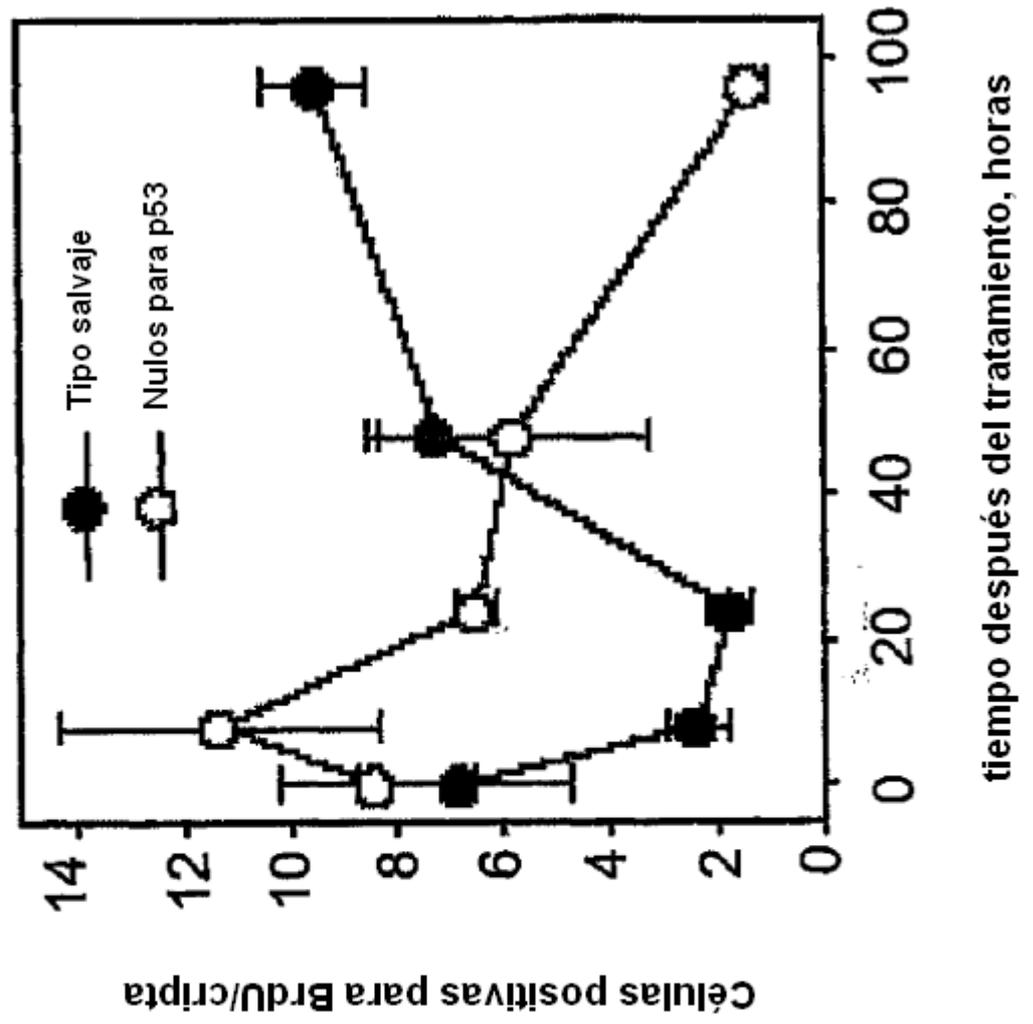


Figura 2c

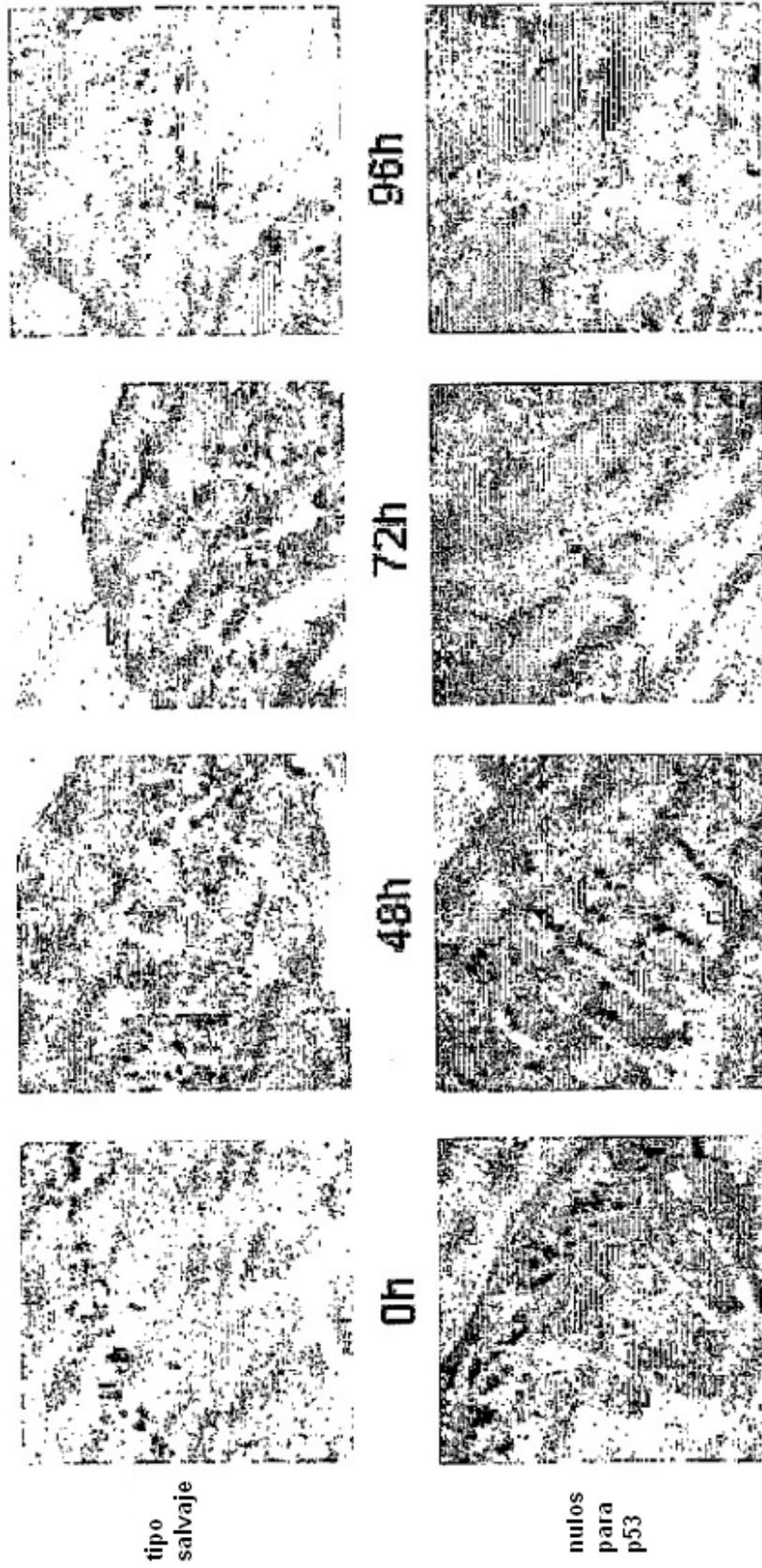


Figura 3

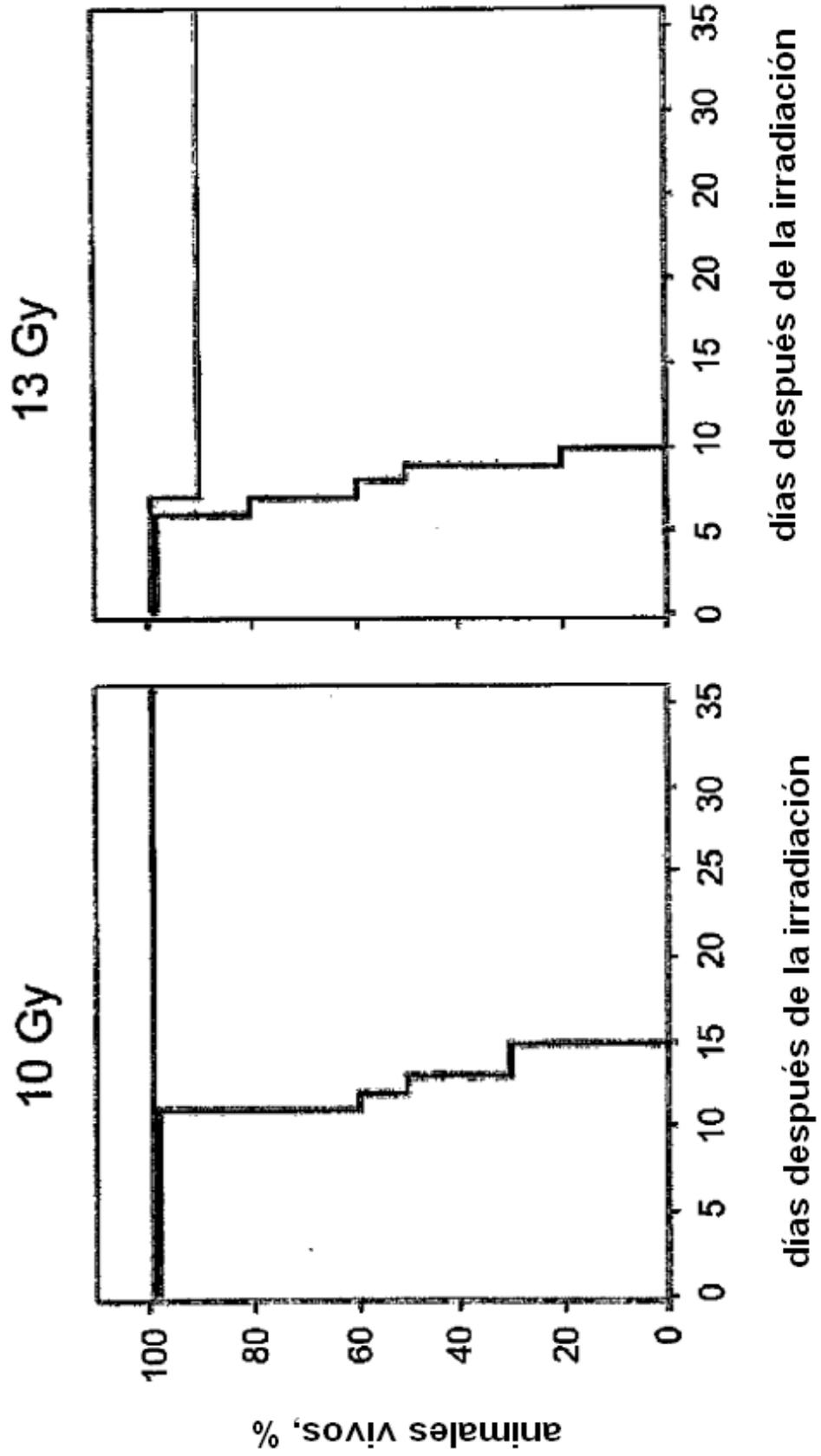
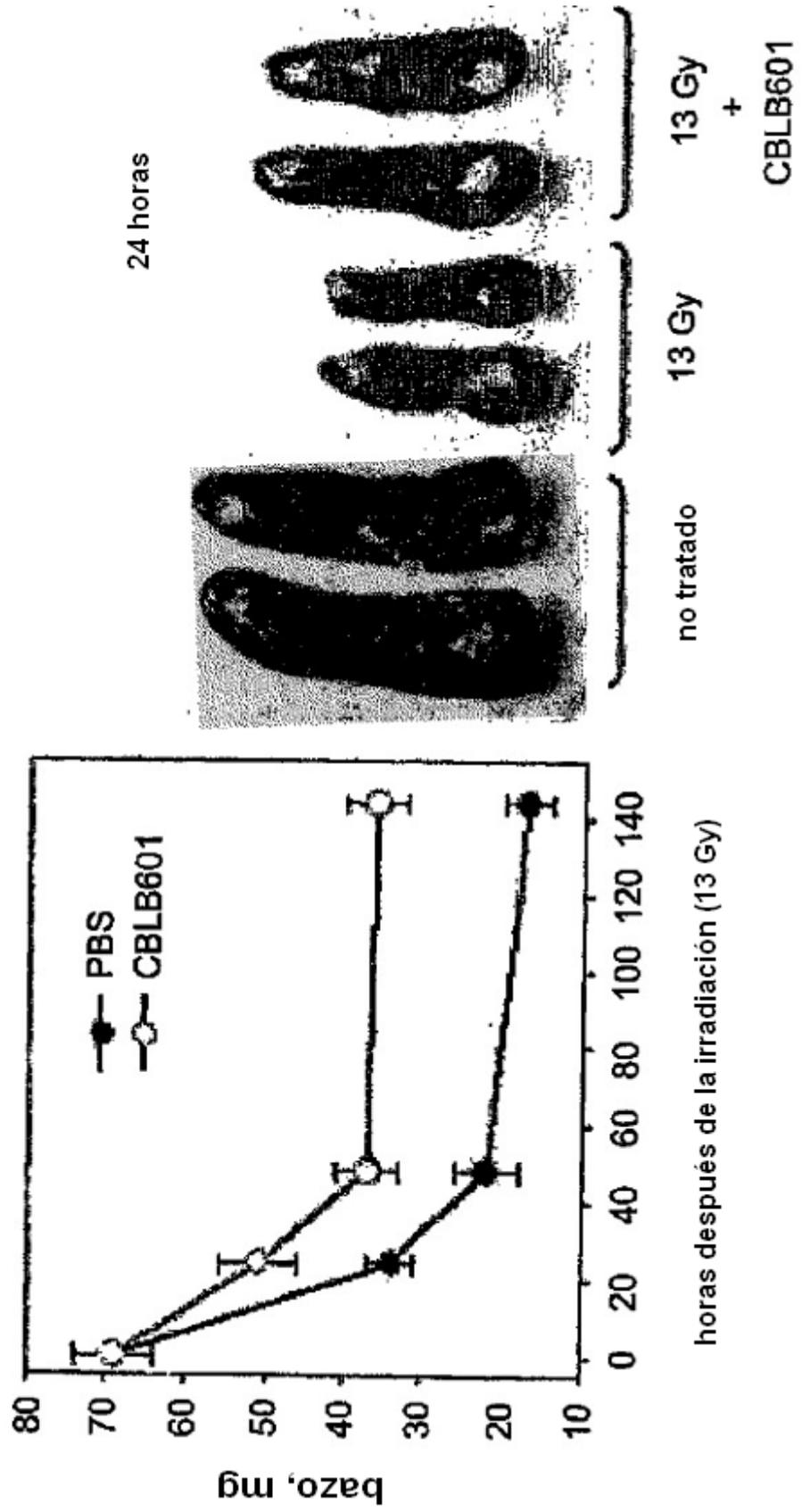


Figura 4



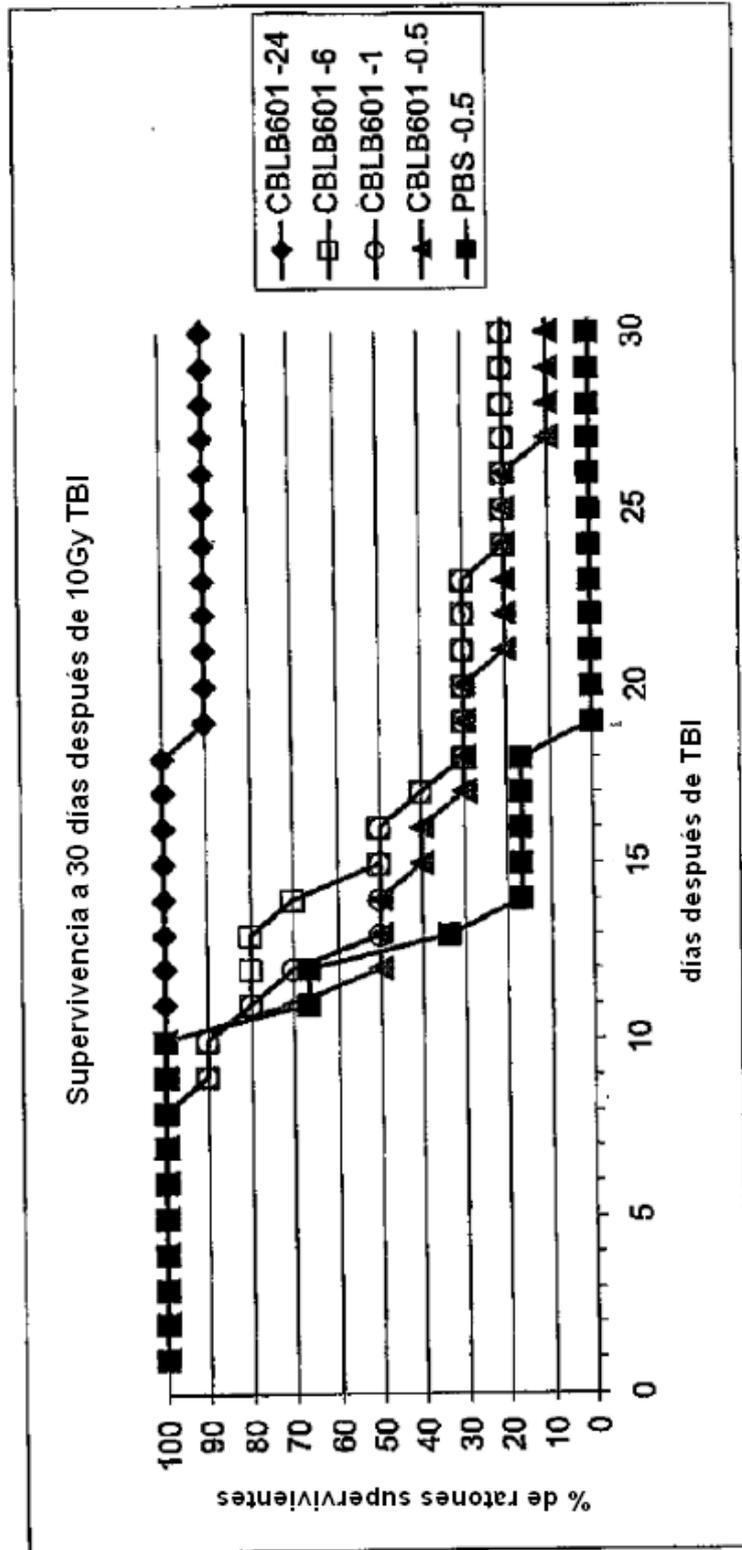


Figura 5a

Figura 5b

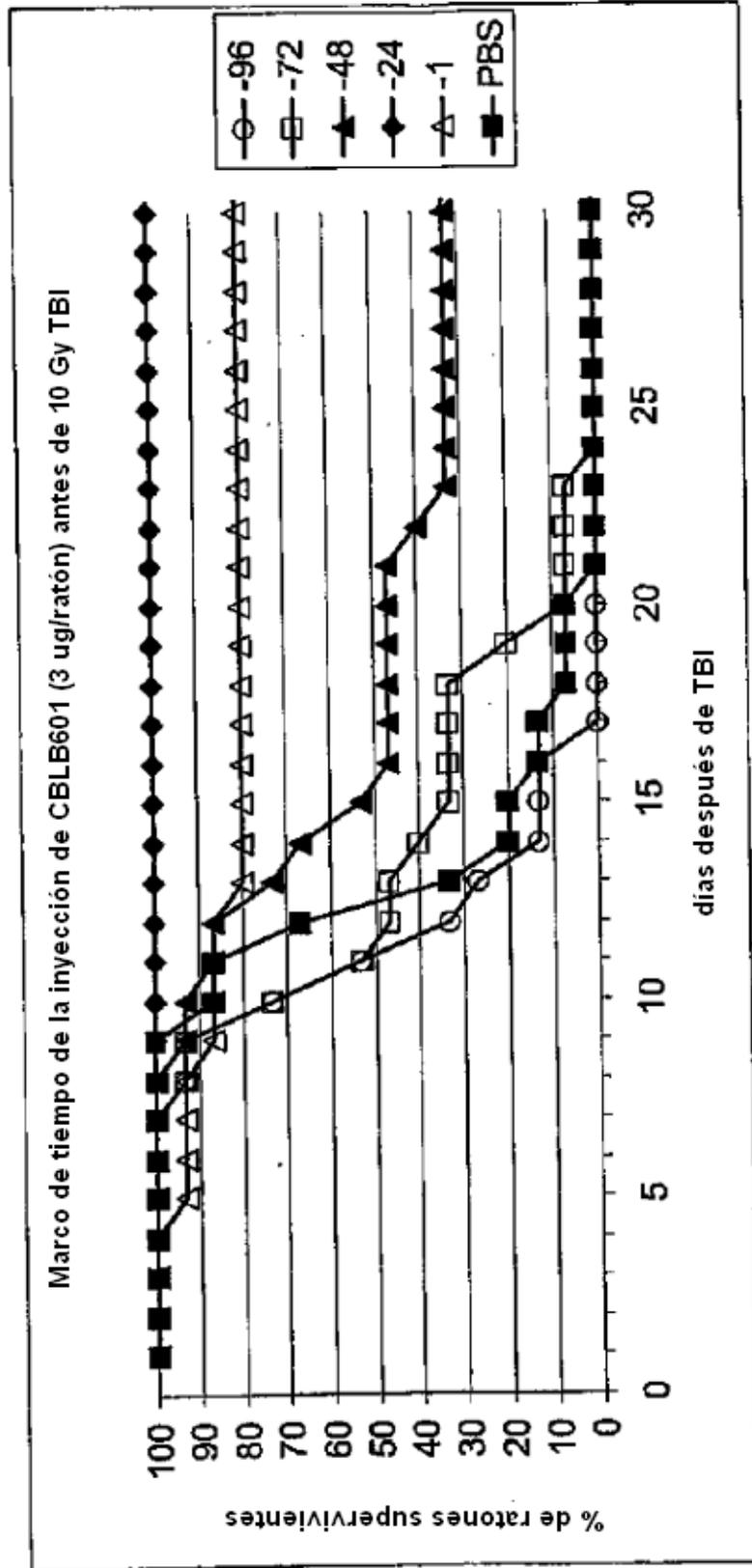


Figura 6a

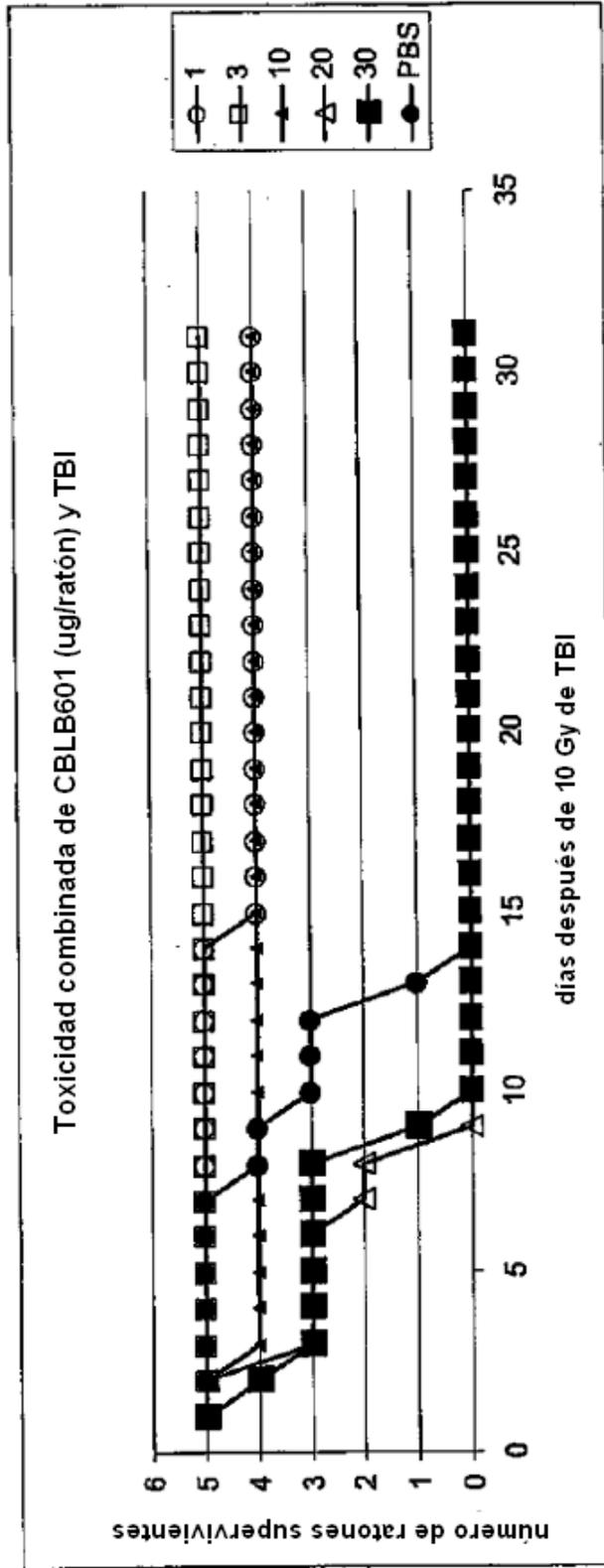


Figura 6b

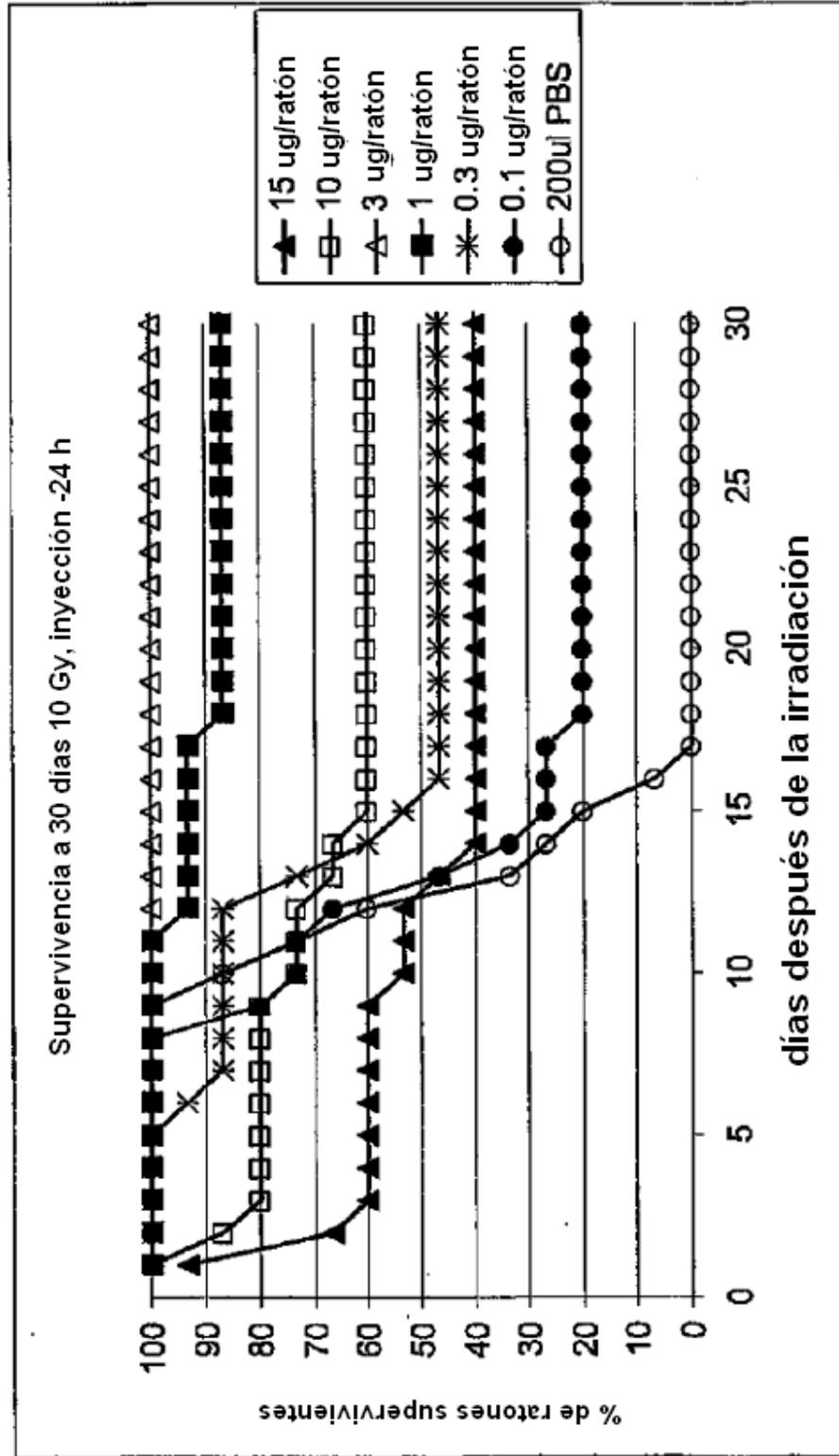


Figura 7a

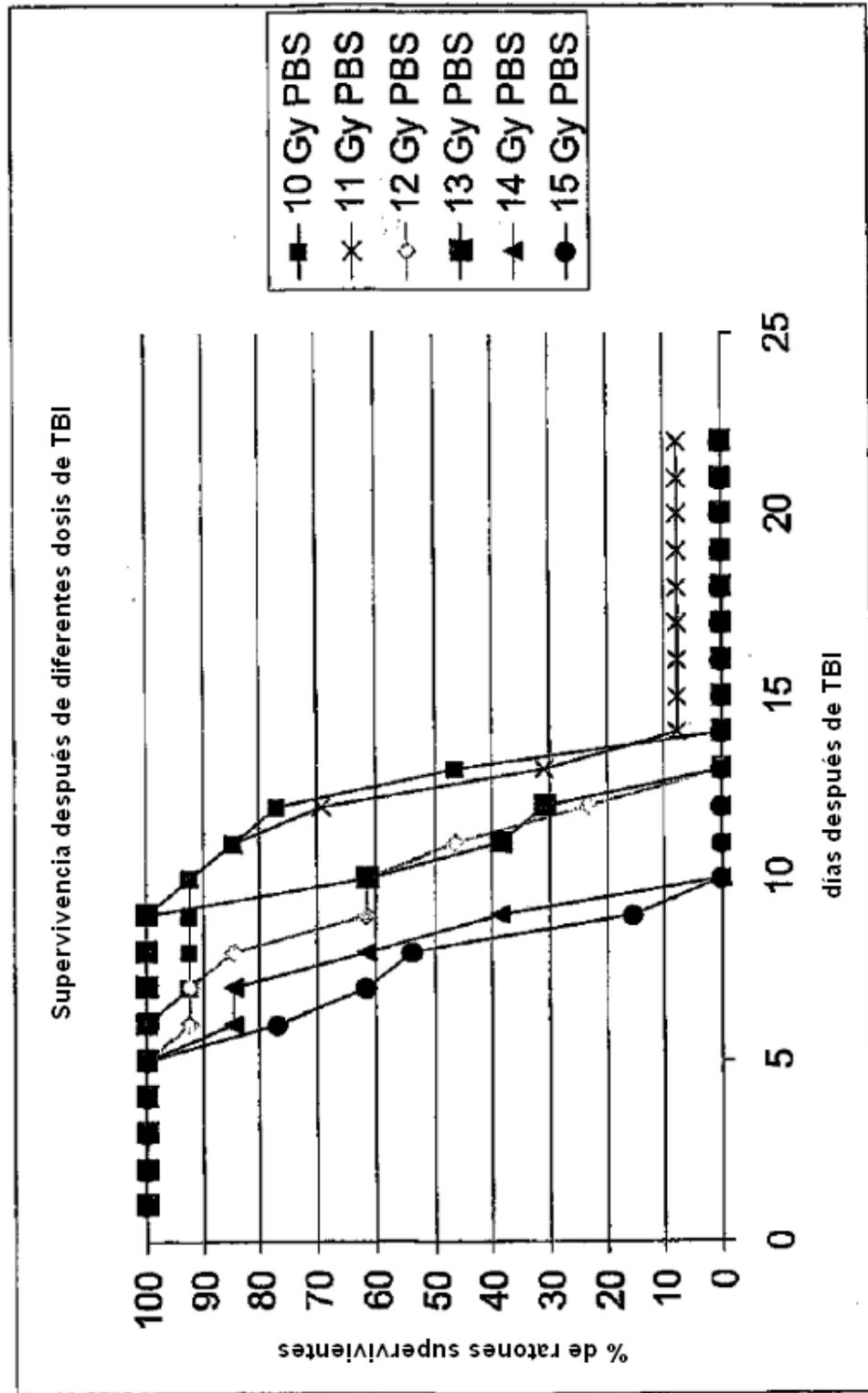


Figura 7b

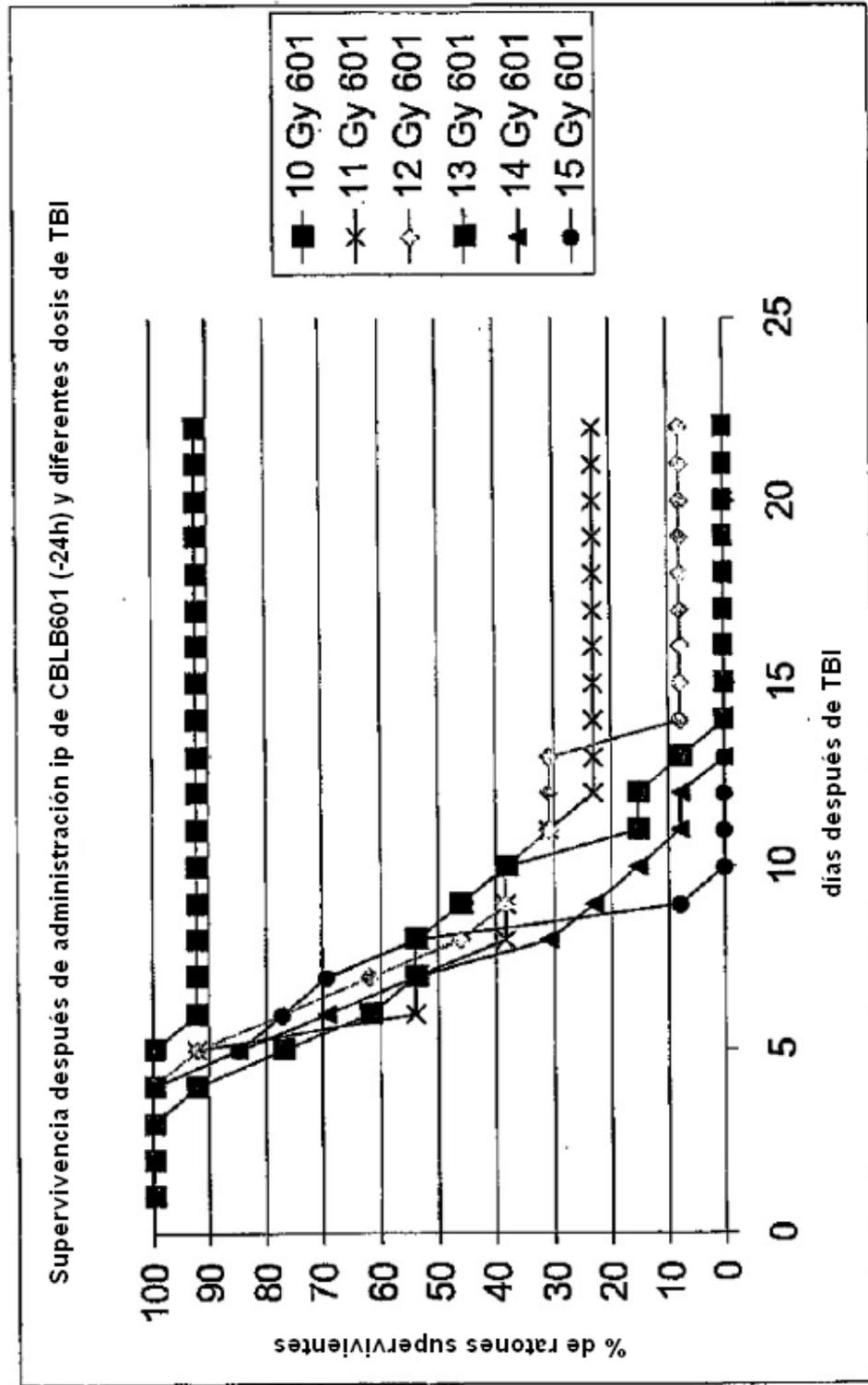


Figura 8

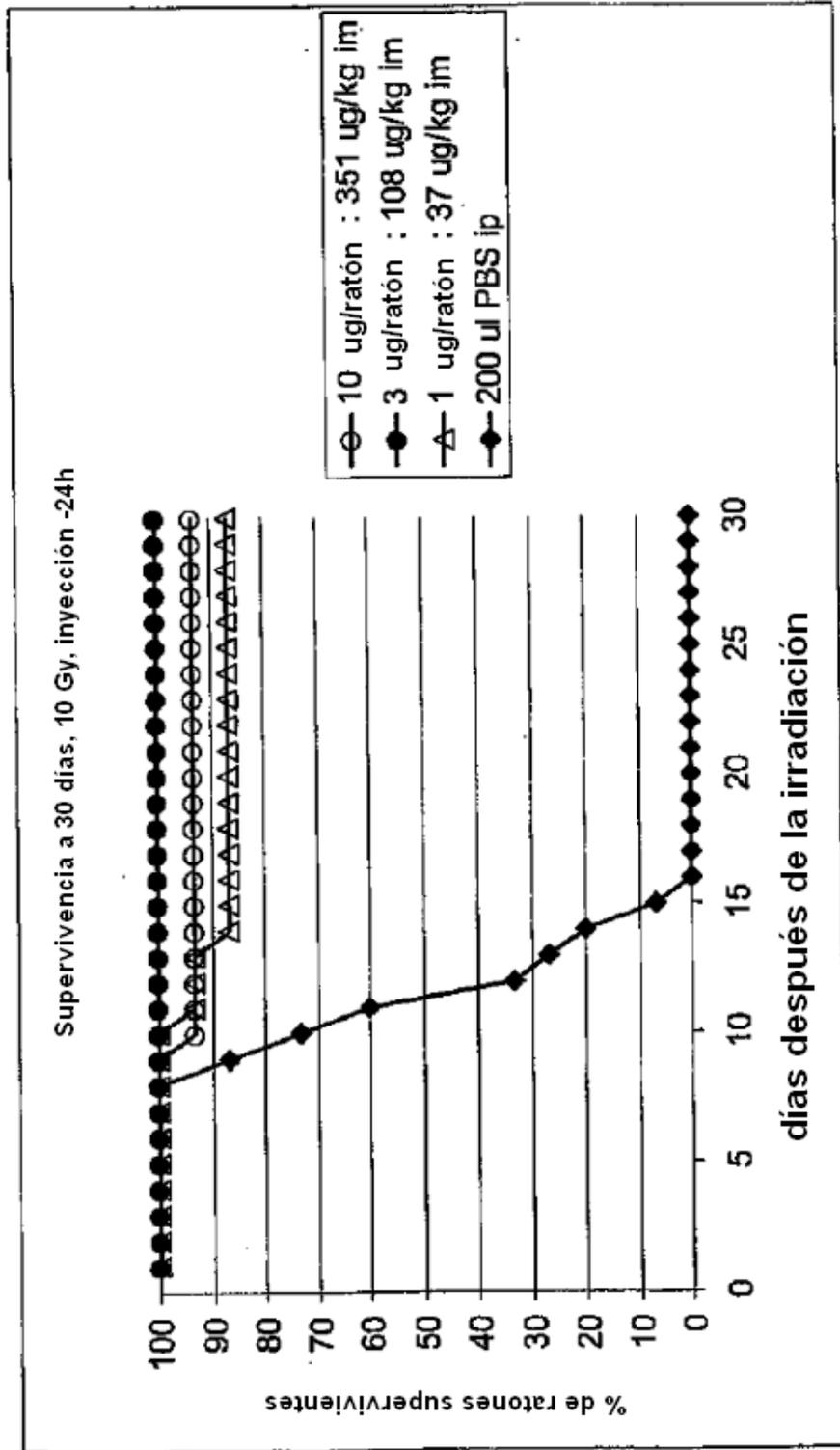


Figura 9

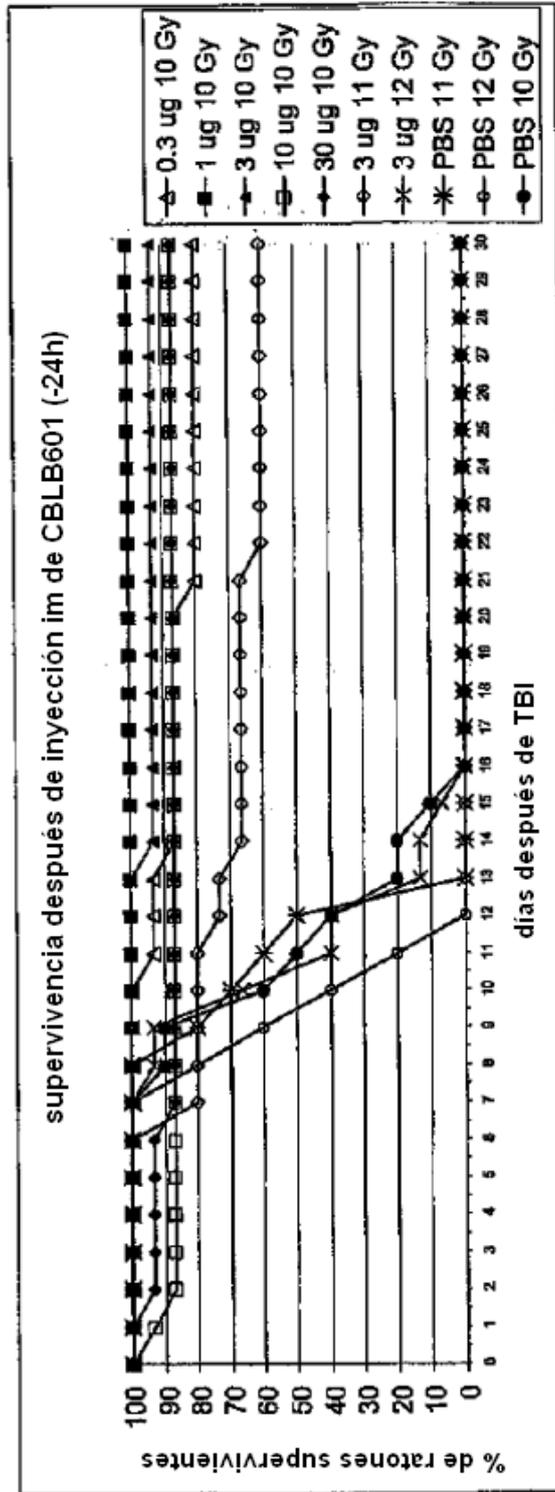


Figura 10

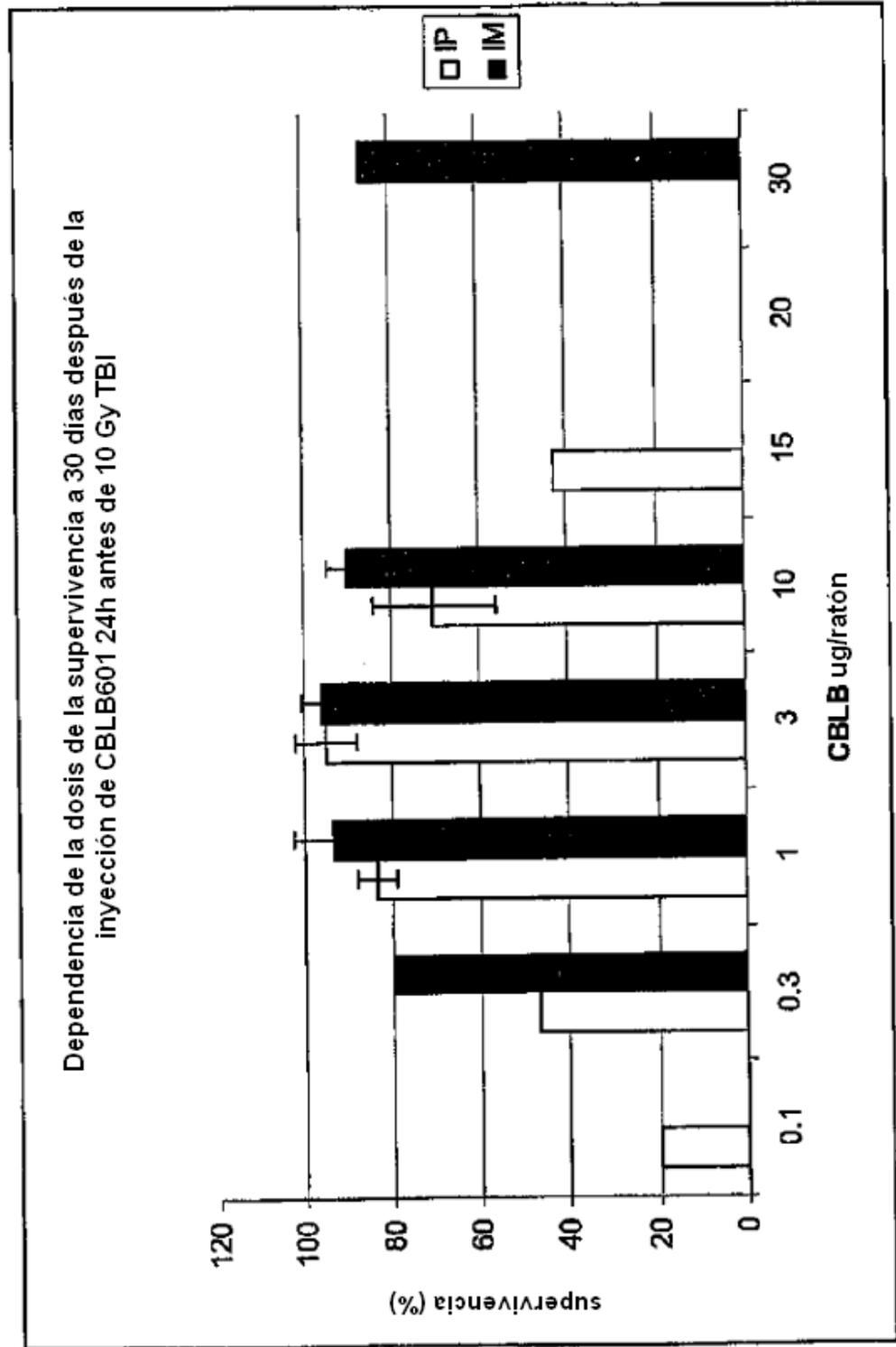


Figura 11

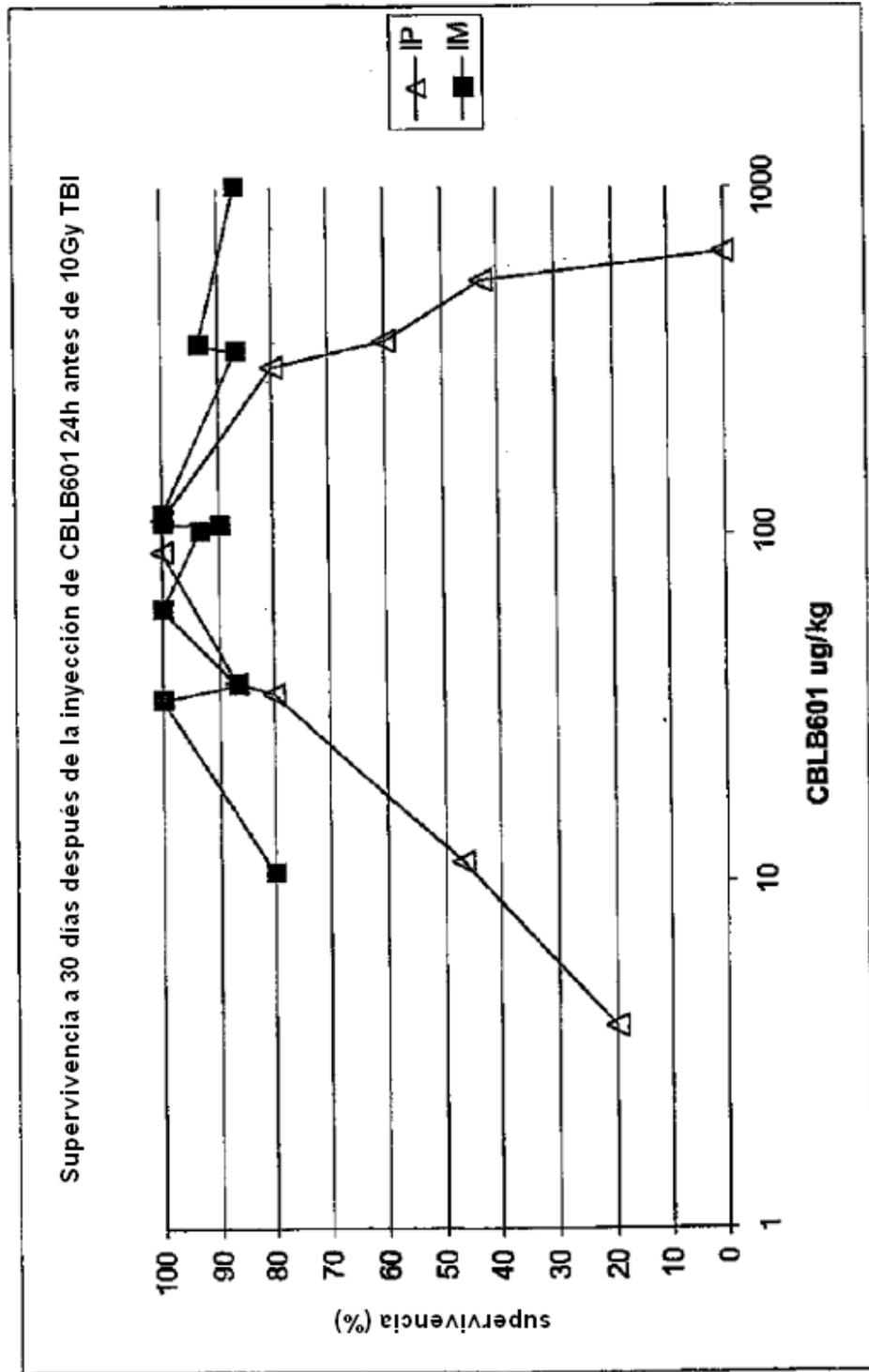


Figura 12a

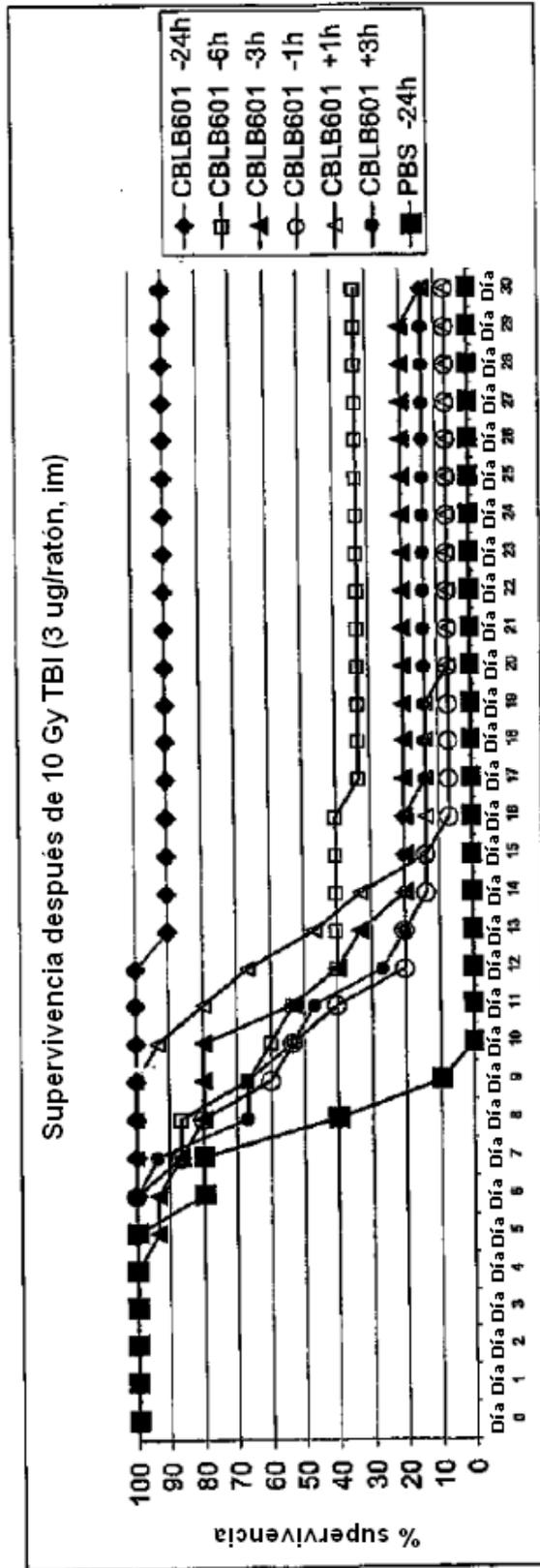


Figura 12b

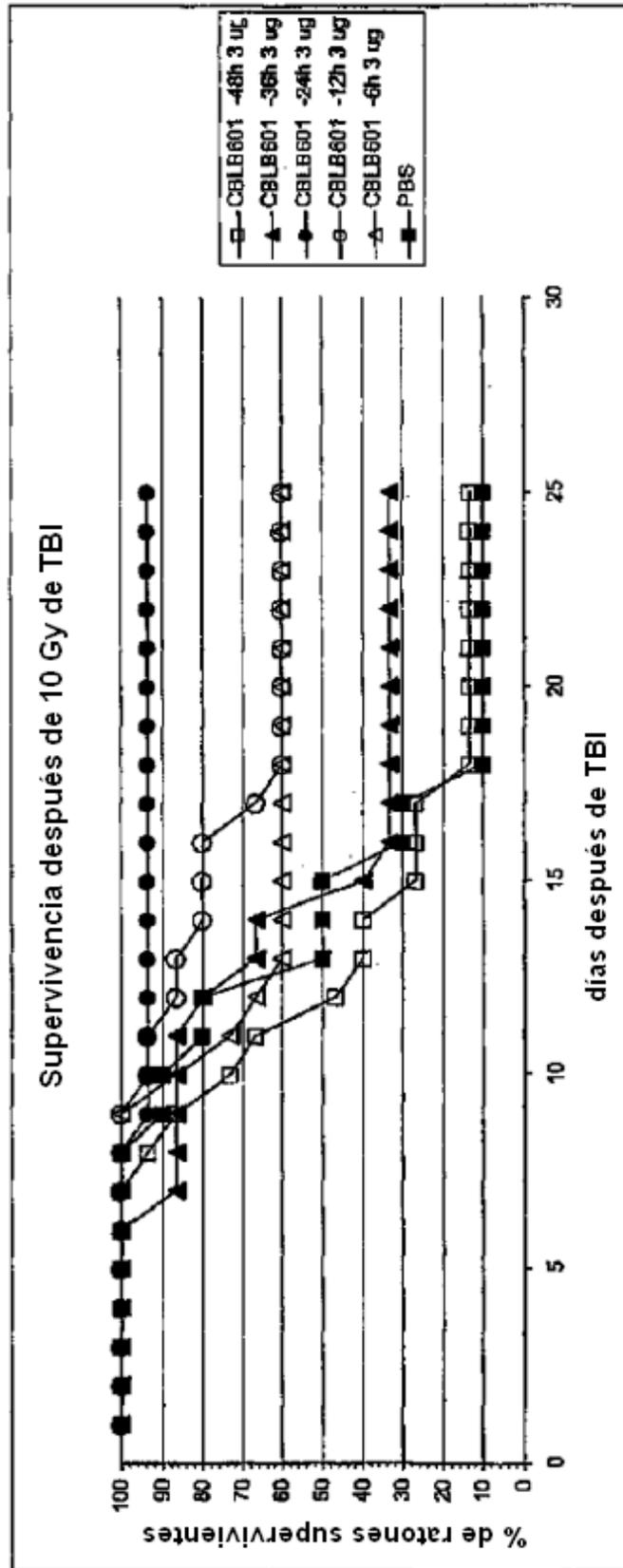


Figura 12c

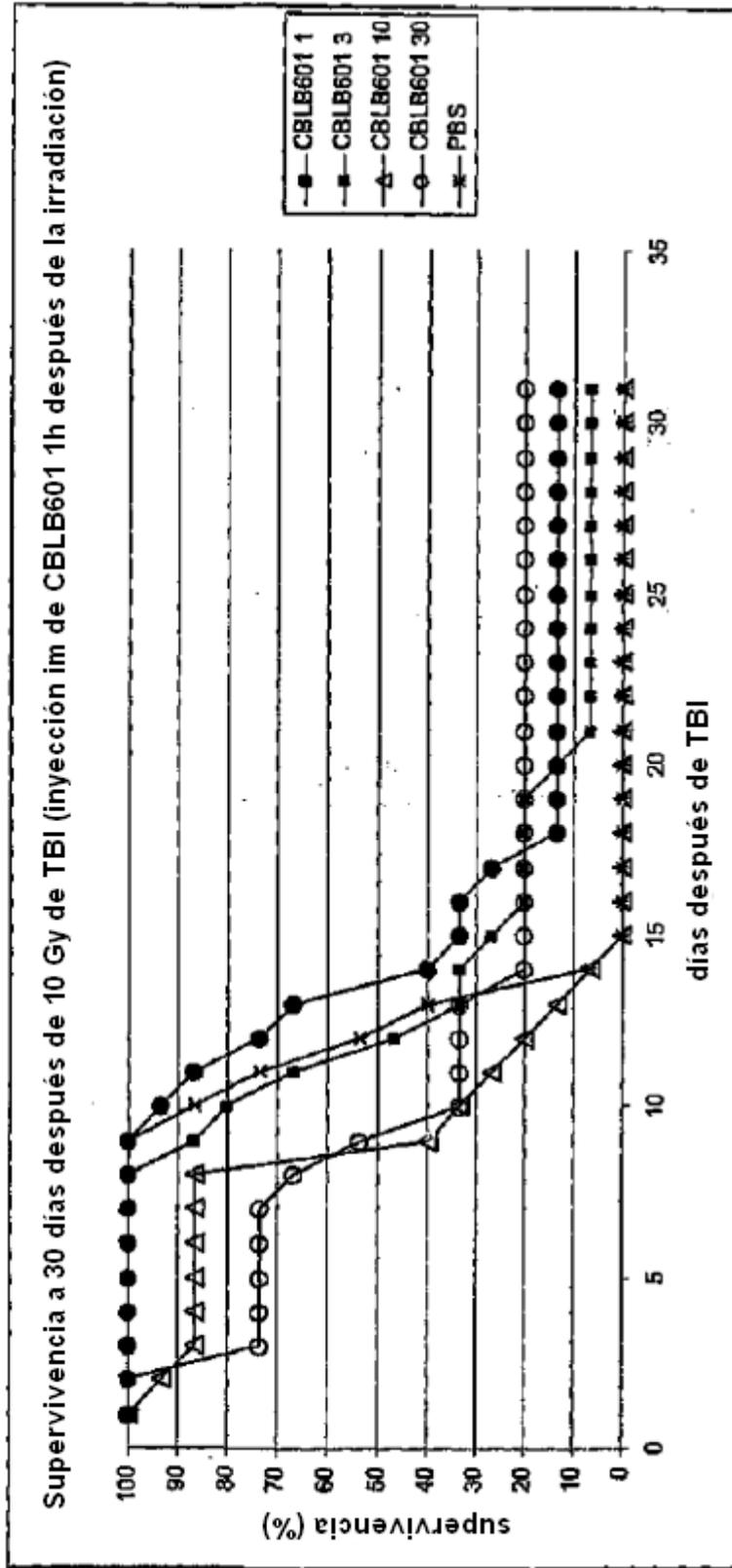


Figura 13

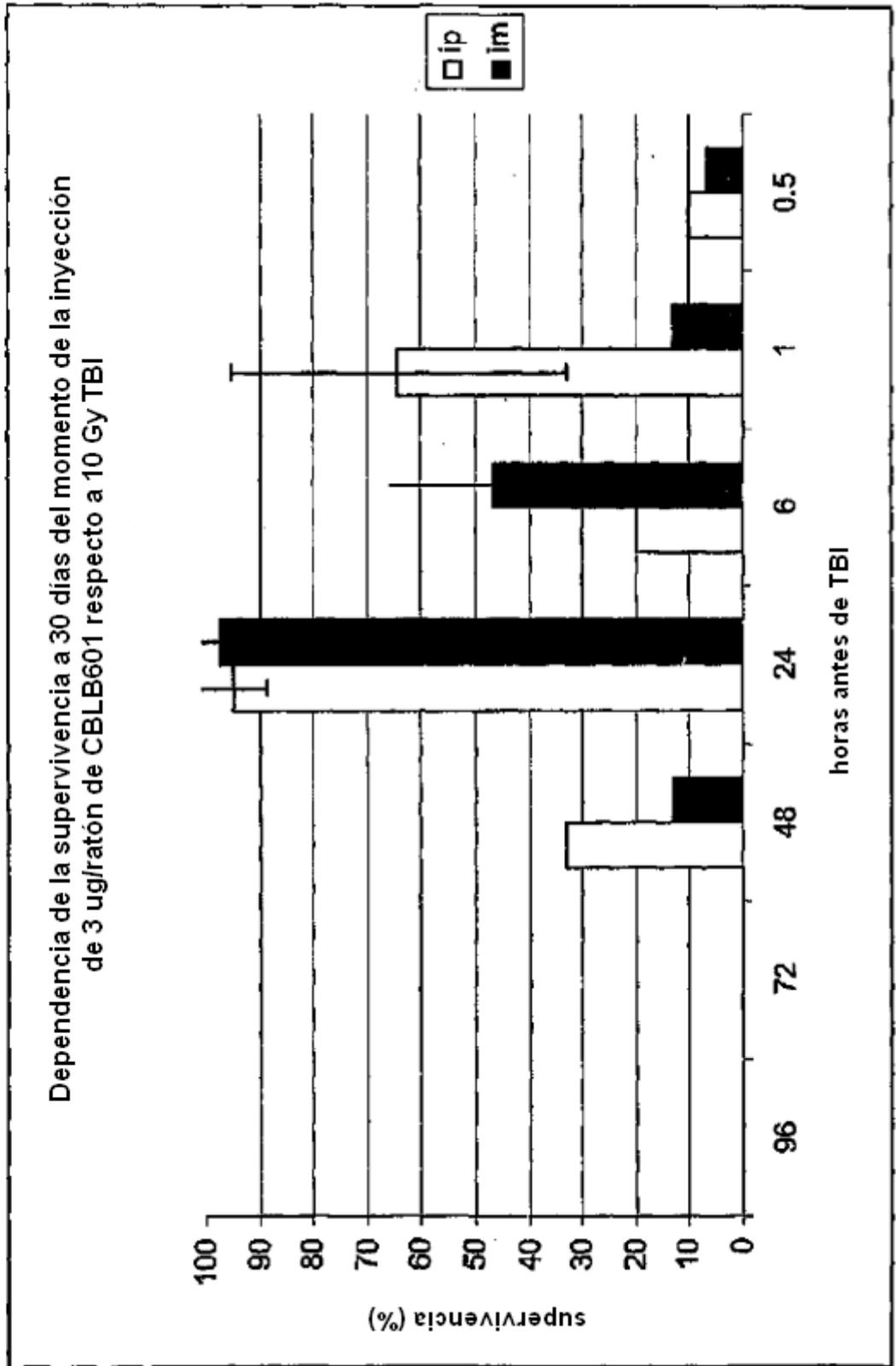


Figura 14

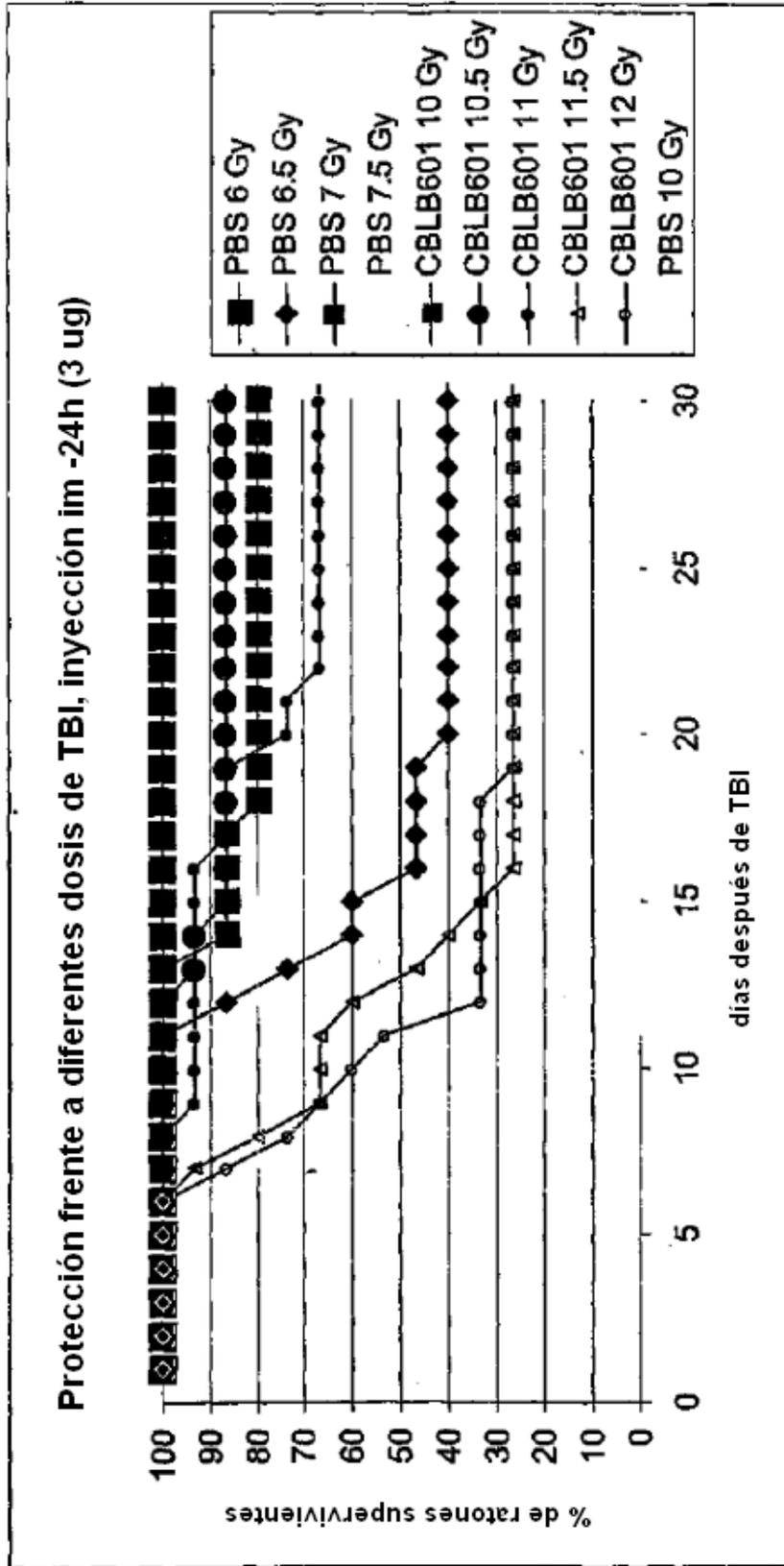


Figura 15

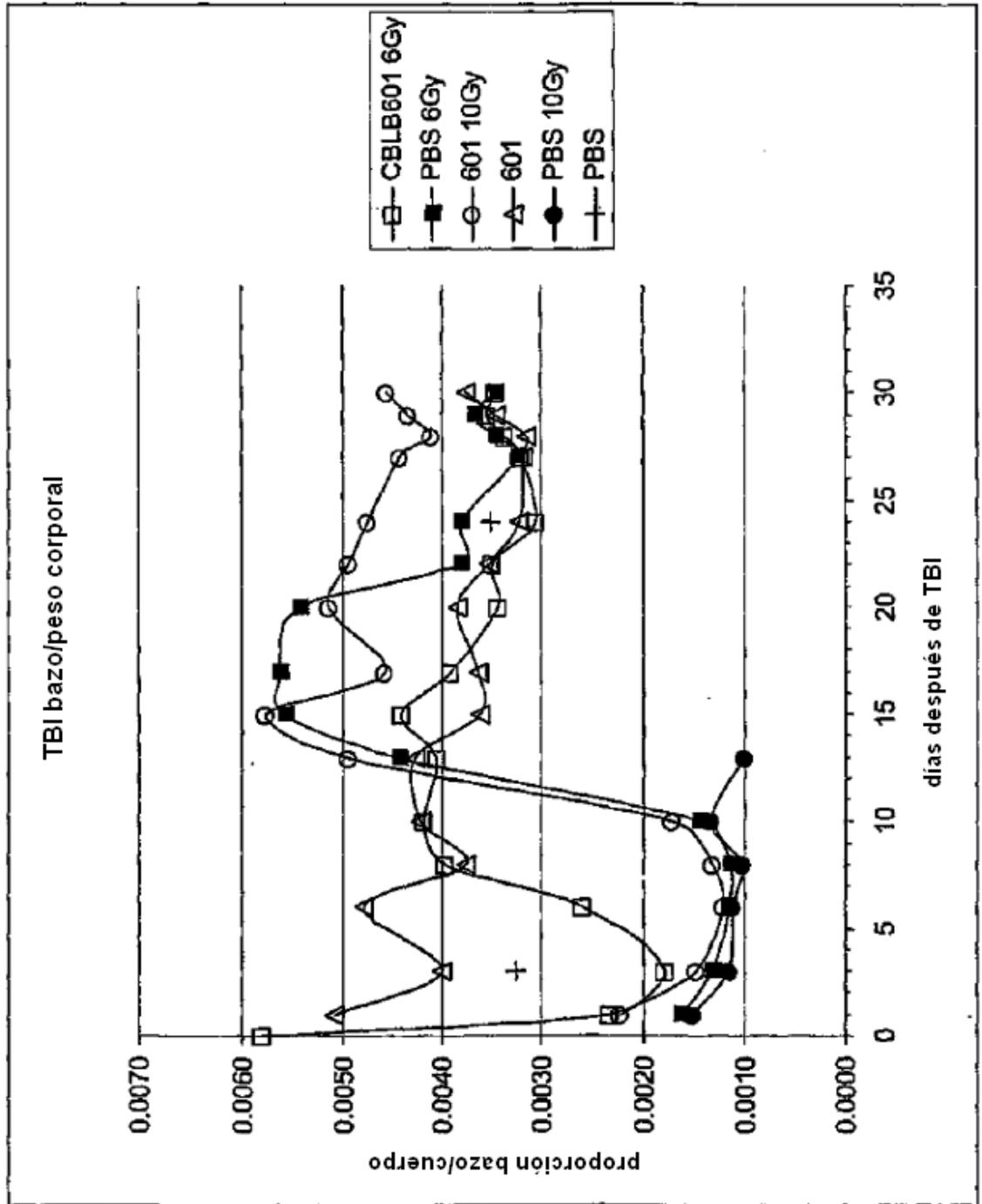


Figura 16a

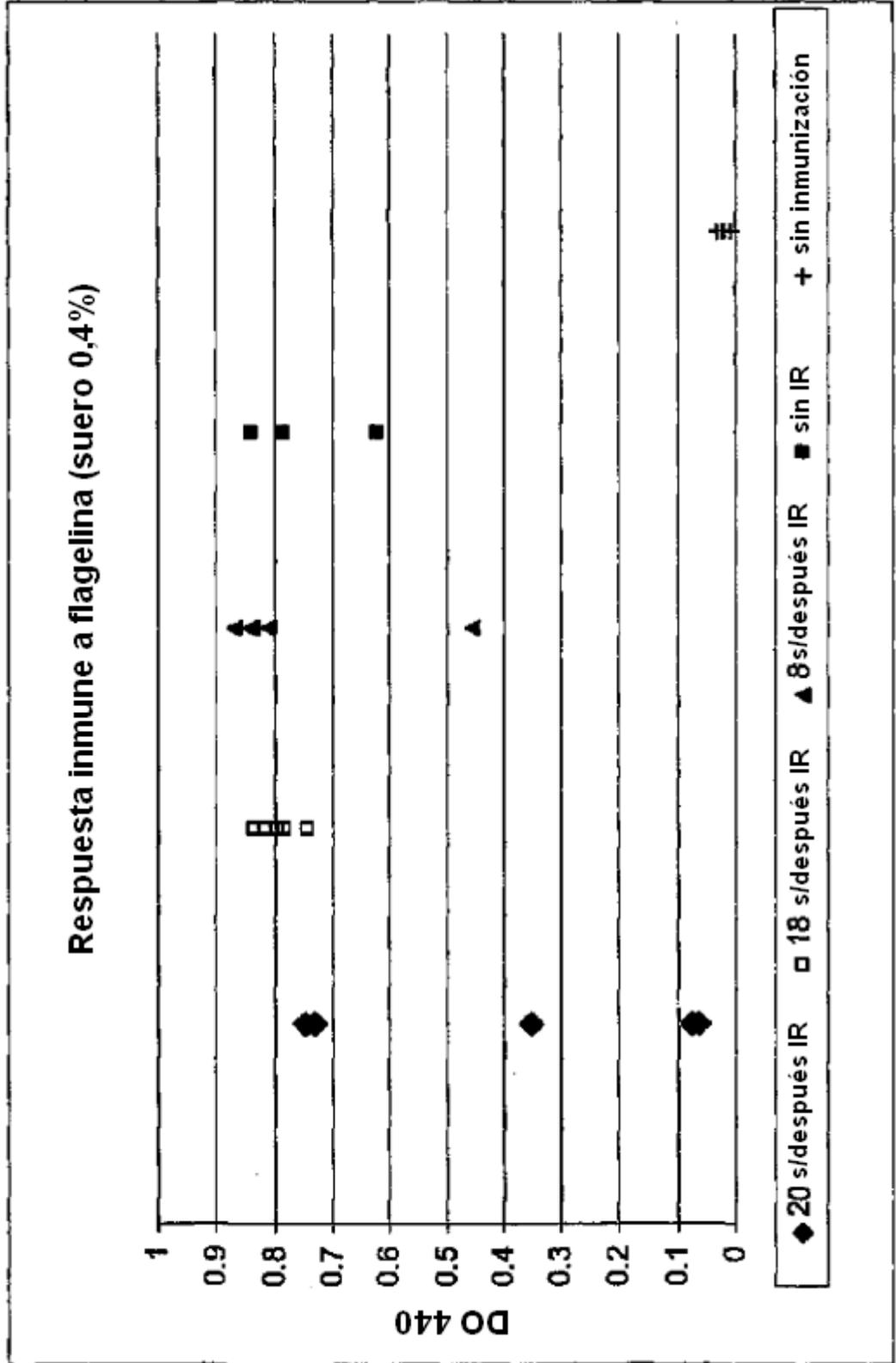


Figura 16b

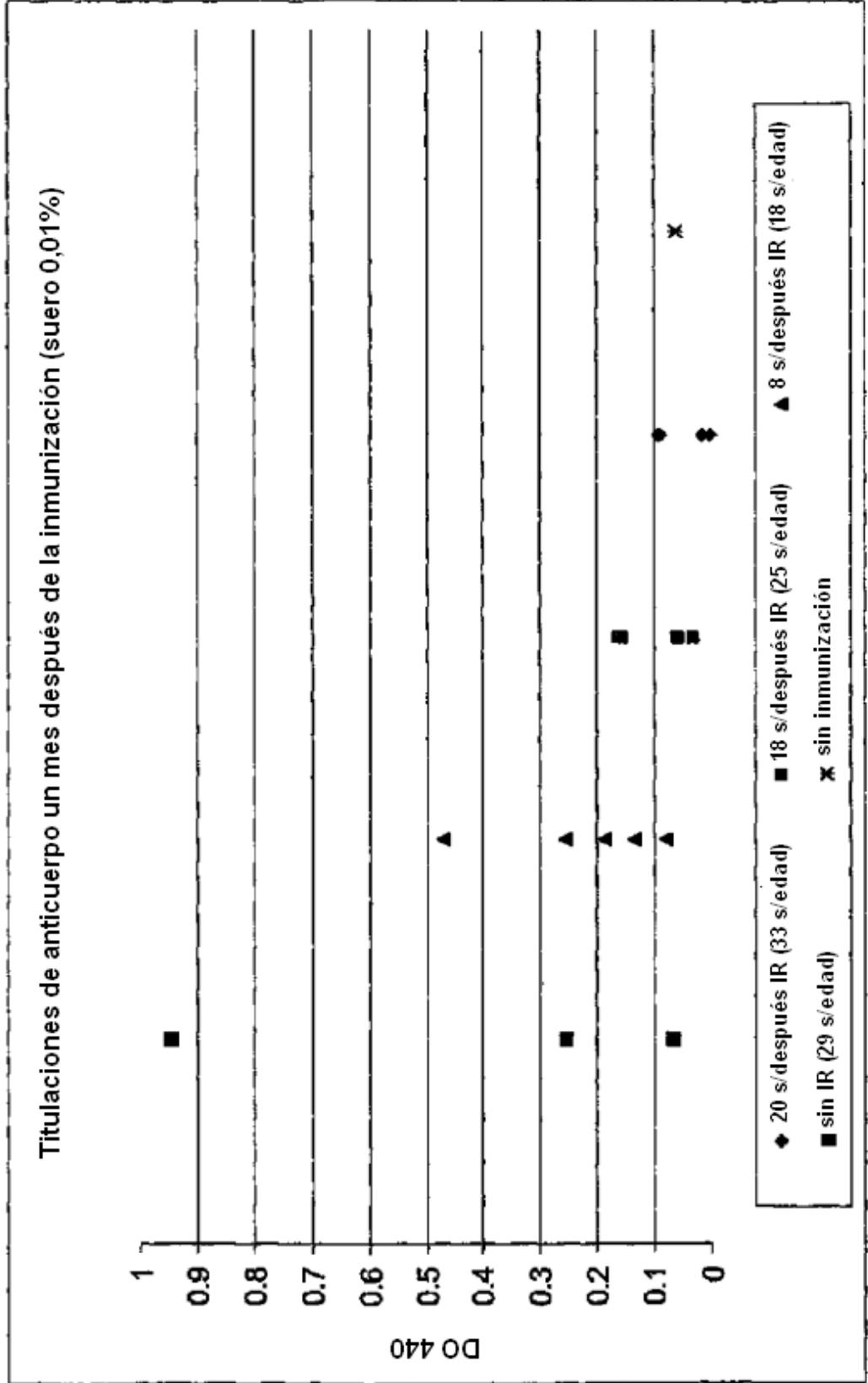


Figura 16c

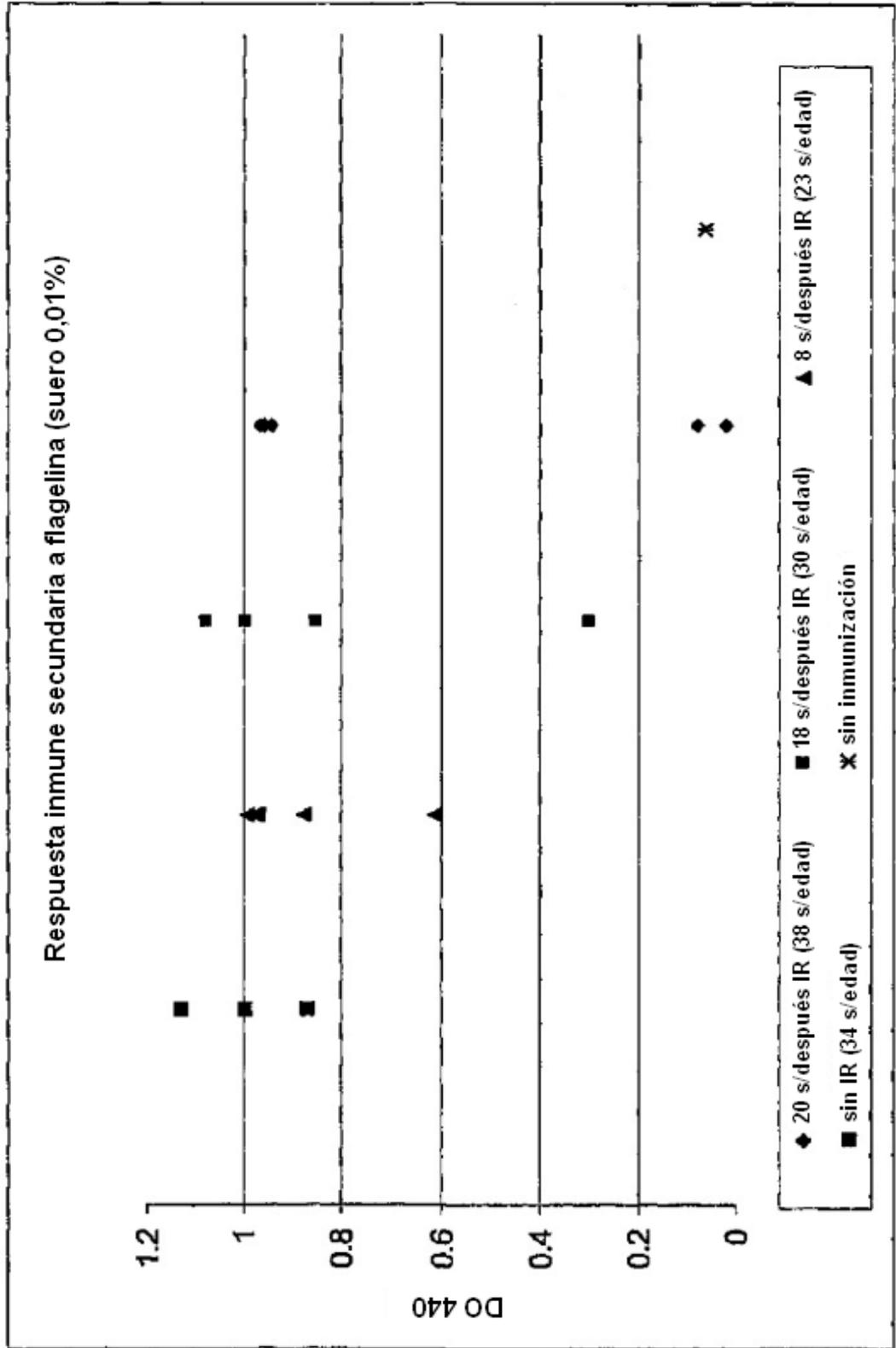


Figura 17

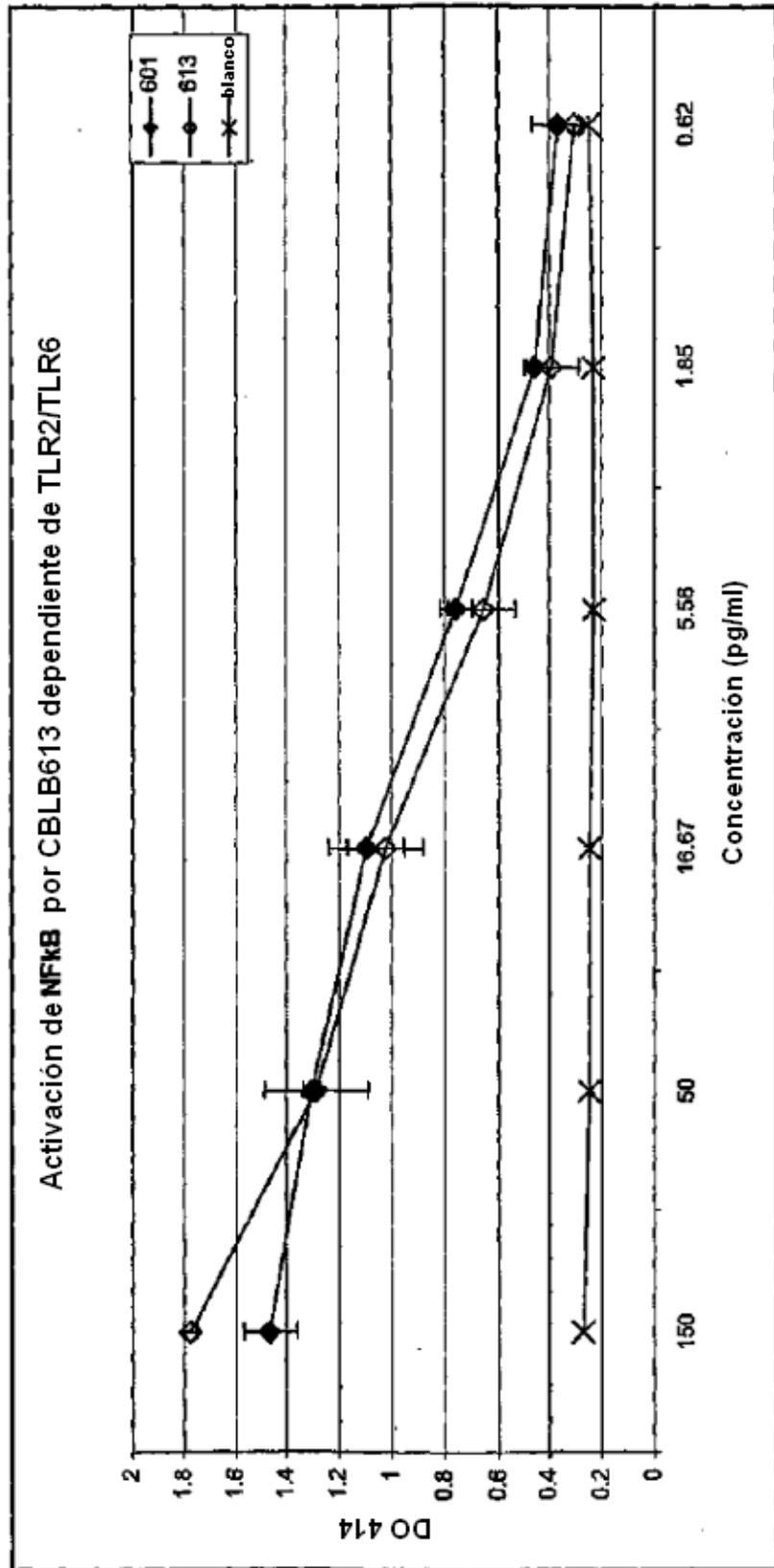


Figura 18a

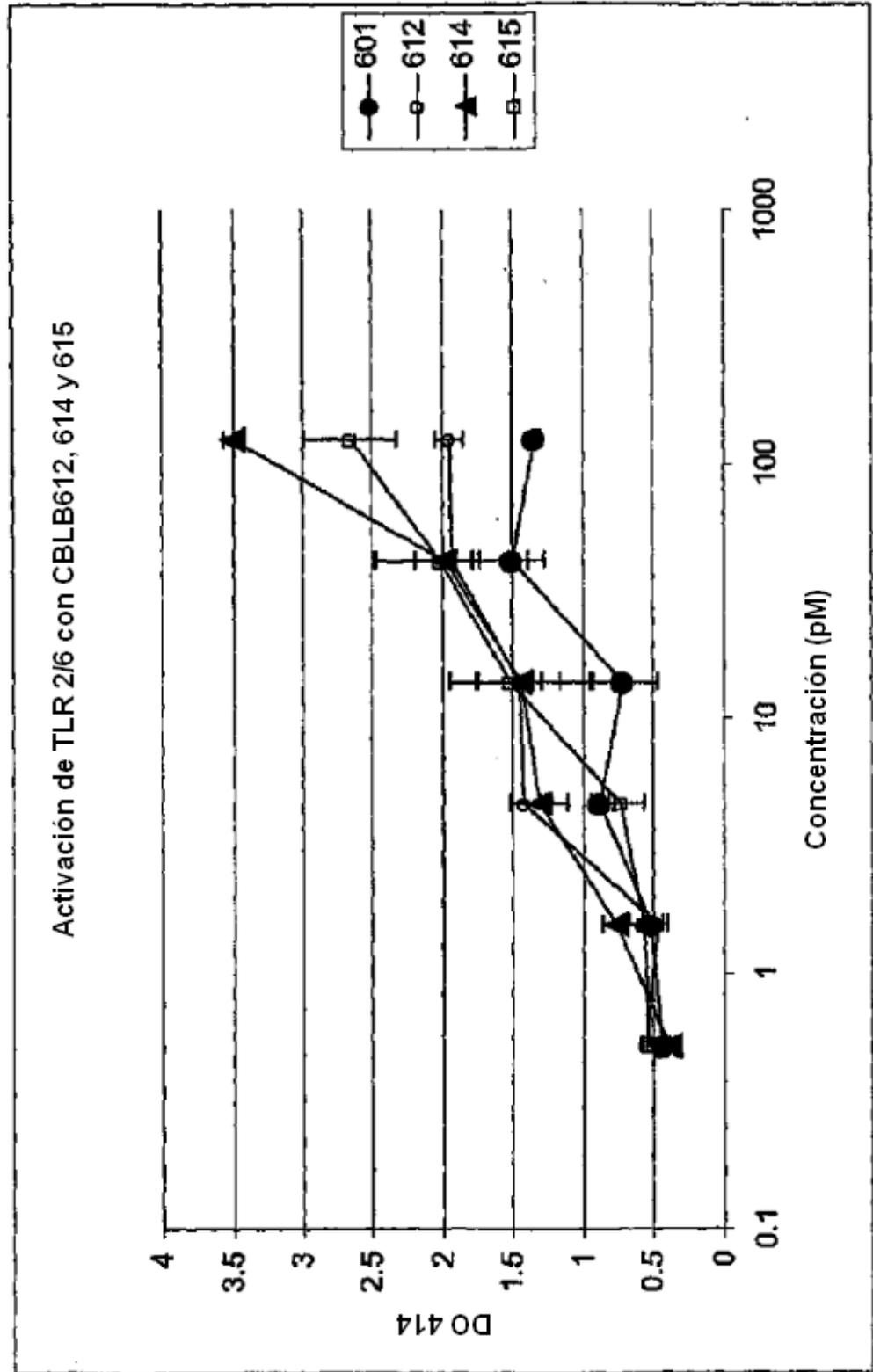


Figura 18b

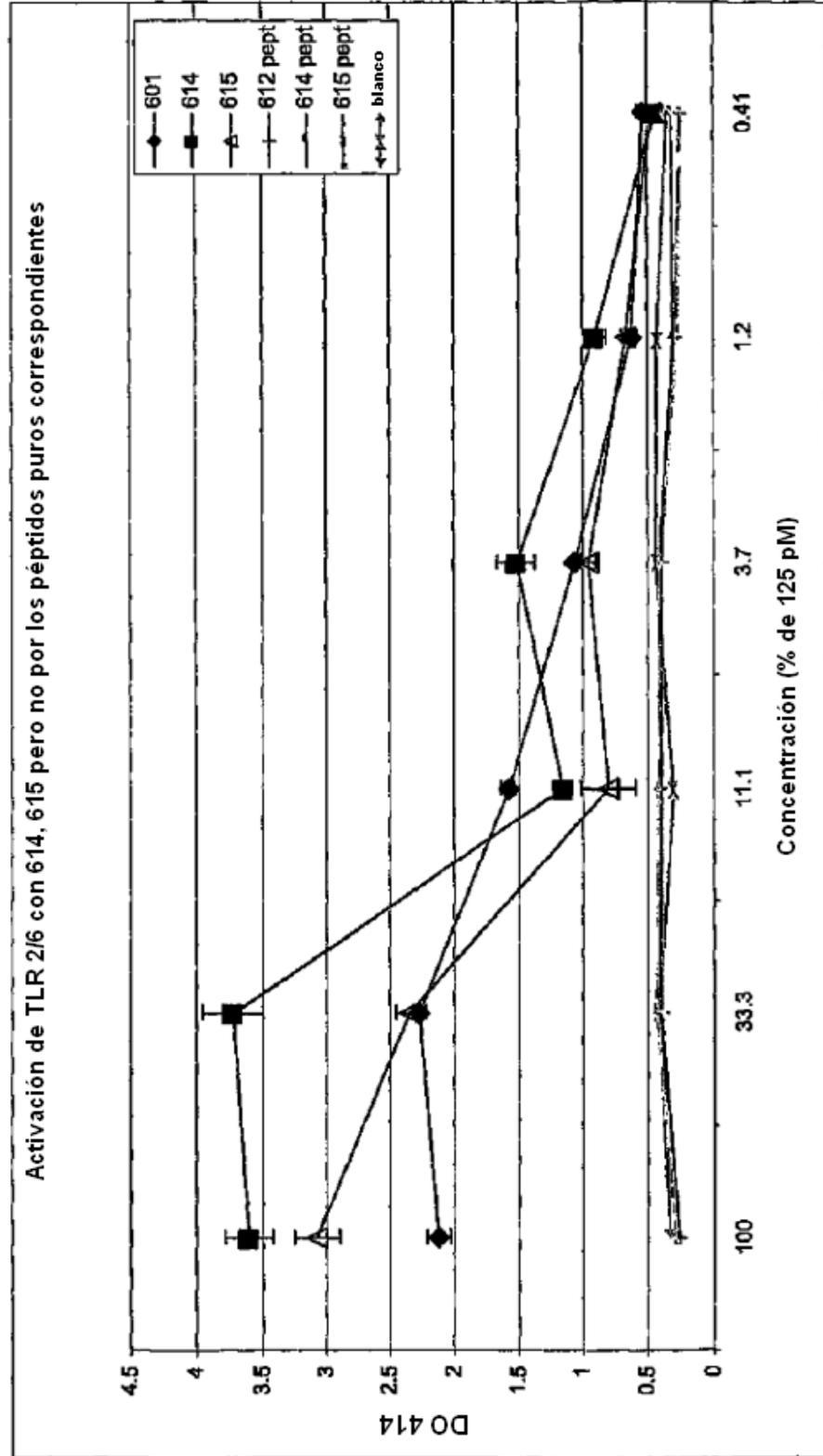


Figura 19

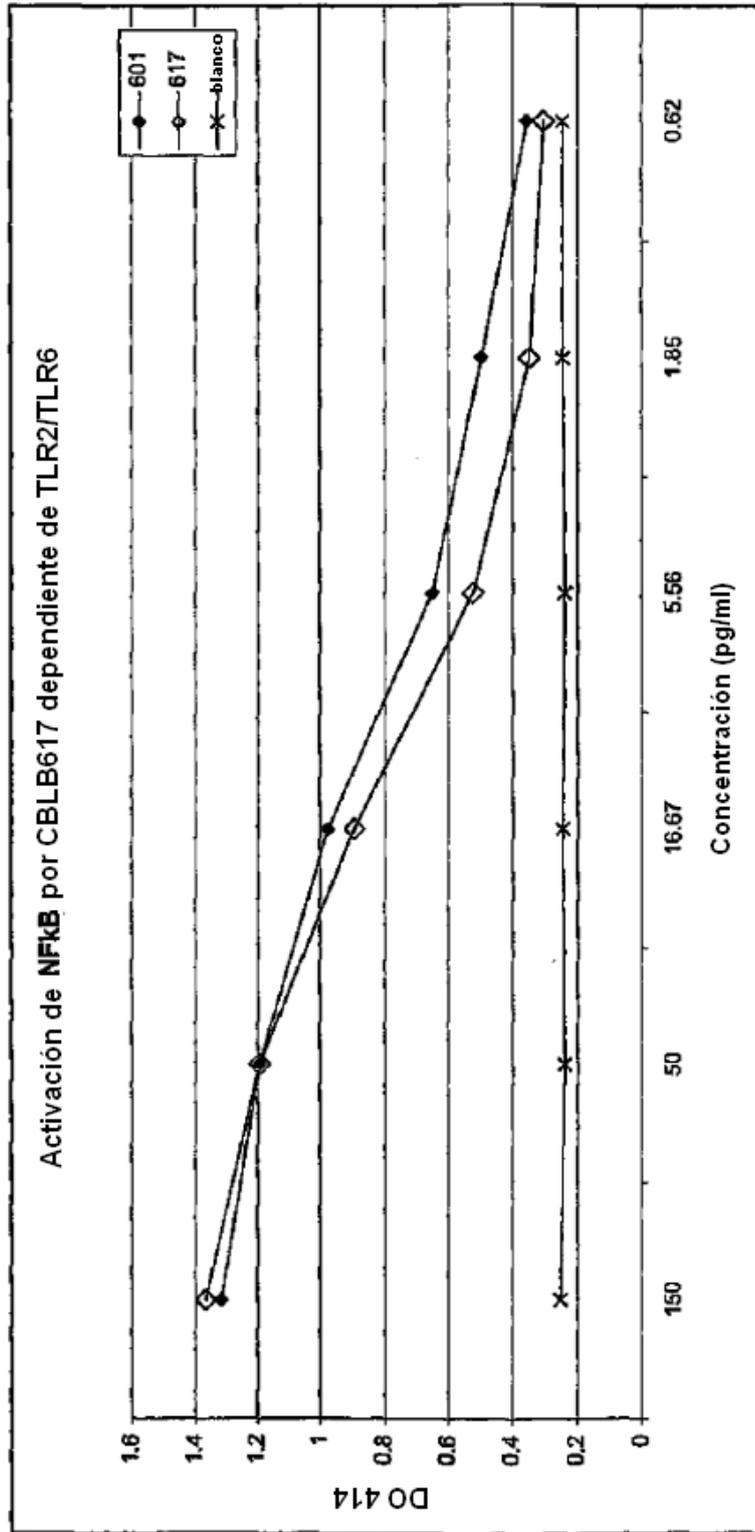


Figura 20

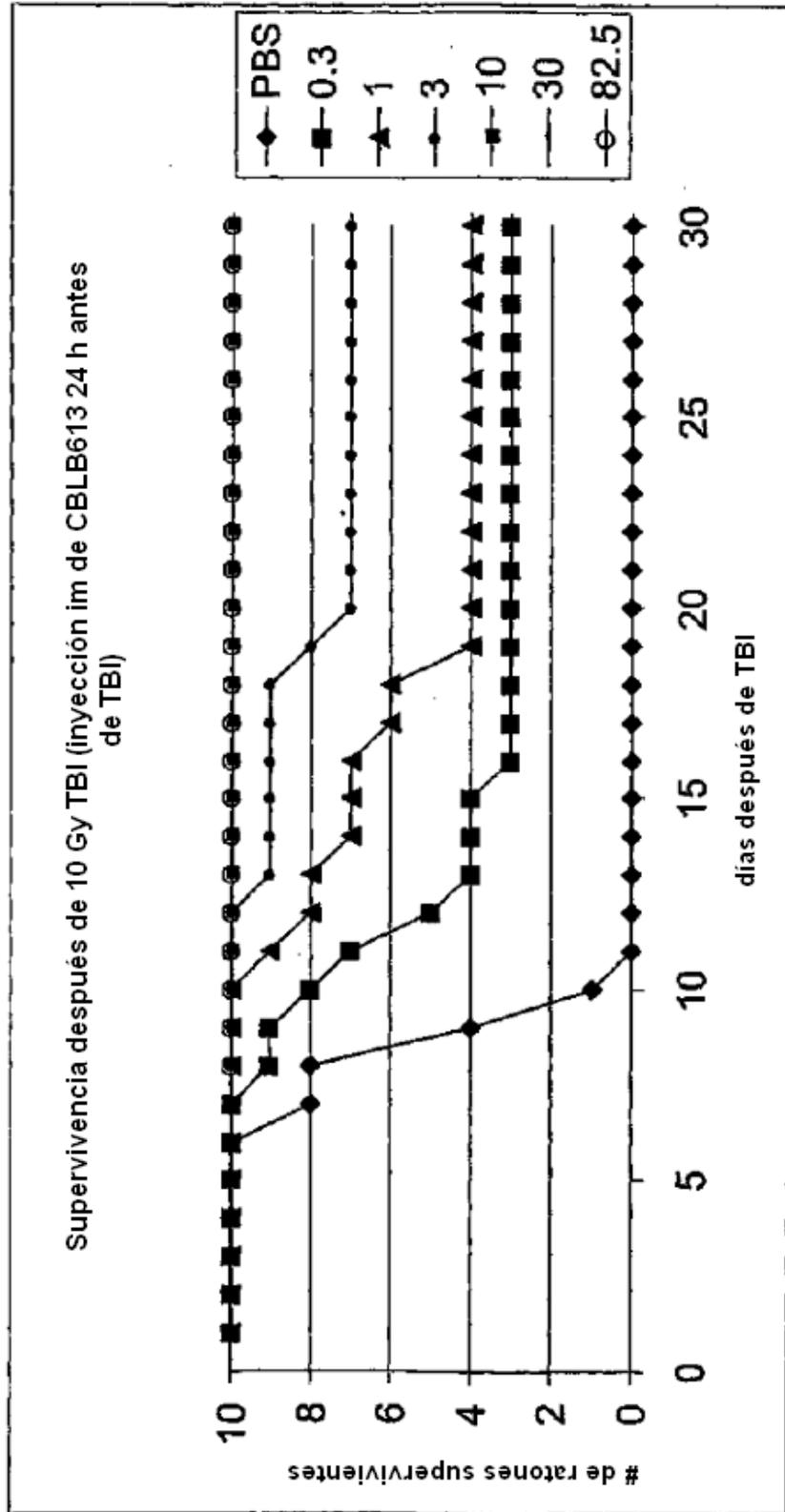


Figura 21

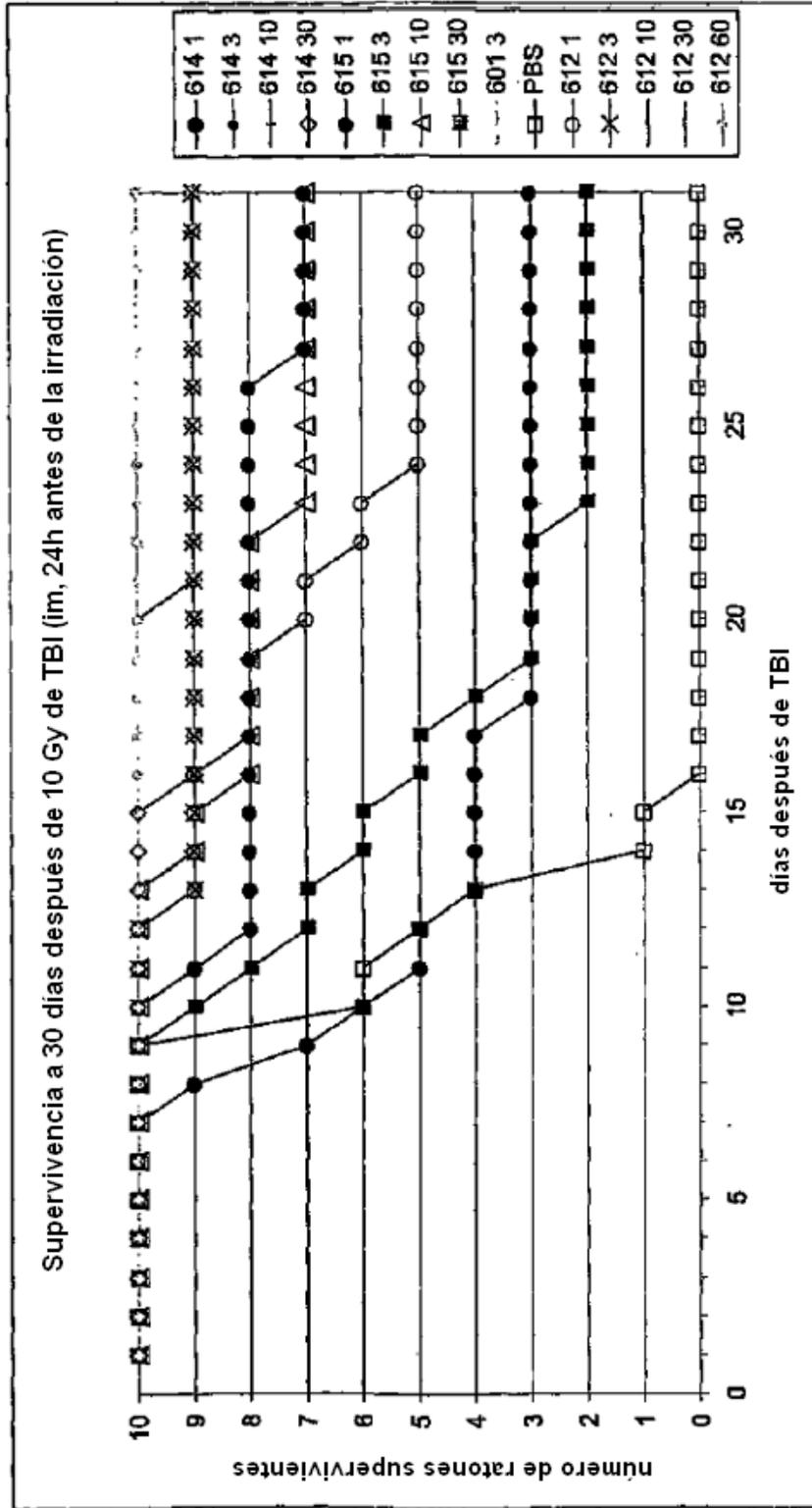


Figura 22

