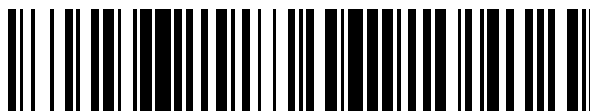


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 438**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/05** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61N 5/10** (2006.01)

**A61P 37/04** (2006.01)

**A61P 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2009 E 09818038 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2349311**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de la exposición a la radiación**

30 Prioridad:

**30.09.2008 NZ 57166508**

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

**19.12.2013**

73 Titular/es:

**INNATE IMMUNOTHERAPEUTICS LIMITED  
(100.0%)  
4B Walls Road Penrose  
Auckland 1061, NZ**

72 Inventor/es:

**GELDER, FRANK B. y  
WEBSTER, GILLIAN ALISON**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 435 438 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**

Composiciones y métodos para el tratamiento de la exposición a la radiación.

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a un inmunoestimulante y en particular, al uso de un inmunoestimulante en forma de una micropartícula de un dipéptido de muramilo reticulado en el tratamiento de la exposición a la radiación, el envenenamiento por radiación, y la mitigación de los efectos tóxicos de la radioterapia.

10 La invención se desarrolló principalmente para usar como un tratamiento para la exposición a la radiación y se describirá en lo sucesivo con referencia a esta aplicación. Sin embargo, se apreciará que la invención no se limita a este campo de uso particular.

## 15 Antecedentes de la invención

Cualquier discusión del estado anterior de la técnica en toda esta memoria no se puede considerar en modo alguno como una admisión de que dicho estado anterior de la técnica es ampliamente conocido o forma parte del conocimiento general común en el área.

20 La exposición a la radiación puede, en algunos casos, conducir al envenenamiento por radiación, que es una forma de daño a los tejidos biológicos debido a una mayor exposición a una fuente de radiación ionizante. "Envenenamiento por radiación" se utiliza generalmente para referirse a los problemas agudos causados por una gran dosis de radiación en un período corto de tiempo, aunque esto puede ocurrir con la exposición a bajos niveles de radiación a largo plazo. Muchos de los síntomas del envenenamiento por radiación se deben a interferencia entre la radiación ionizante y la división celular.

30 La radiación ionizante contiene partículas u ondas altamente energéticas que pueden desprender al menos un electrón de un átomo o molécula, de esa manera ionizándolo. La capacidad ionizante es una función de la energía de las partículas individuales o las ondas y no una función de la cantidad. Una gran cantidad de partículas u ondas no causará ionización, en las situaciones más comunes, si las partículas individuales o las ondas son insuficientemente energéticas.

35 Los ejemplos de radiación ionizante son las partículas energéticas beta, los neutrones y las partículas alfa. Los rayos X y rayos gamma ionizarán casi cualquier molécula o átomo; la luz ultravioleta lejana ionizará muchos átomos y moléculas; la luz ultravioleta cercana y la visible son ionizantes para muy pocas moléculas; las microondas y las ondas de radio son formas de radiación no ionizante.

40 Los síntomas de la exposición a la radiación pueden variar, pero pueden presentarse con náuseas y vómitos; diarrea; quemaduras cutáneas (radiodermatitis); debilidad; fatiga; pérdida del apetito; desmayo; deshidratación; inflamación (hinchazón, enrojecimiento o sensibilidad) de los tejidos; hemorragia nasal, bucal, gingival o rectal; bajo recuento de glóbulos rojos (anemia) y pérdida de cabello. Los signos y síntomas de la exposición a la radiación dependen de cuánta radiación se ha recibido y cuáles tejidos se han expuesto. La exposición a una fuente radiactiva también se utiliza en el tratamiento del cáncer. Dicha exposición también puede causar envenenamiento por radiación crónica temporal.

50 En la actualidad no es posible revertir los efectos de la exposición a la radiación. Se administran anestésicos y antieméticos para contrarrestar los síntomas de la exposición junto con antibióticos para contrarrestar las infecciones secundarias debidas a la deficiencia del sistema inmunitario. También pueden ser necesarias transfusiones sanguíneas si se produce anemia.

55 Los fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la contaminación con radiación por un accidente industrial o una bomba sucia incluyen Radiogardasa, pentetato de calcio trisódico (Ca-DTPA) y pentetato de zinc trisódico (Zn-DTPA). Radiogardasa, también conocido como azul de Prusia insoluble, se puede usar para tratar a personas expuestas a radiación que contenga cantidades nocivas de cesio-137 o talio. CA-DTPA y Zn-DTPA se pueden utilizar para la contaminación con formas radiactivas de plutonio, americio y curio. Los tres fármacos actúan eliminando sustancias radiactivas del cuerpo humano.

60 Otro fármaco que puede ser útil en casos de exposición a altas dosis de radiación es filgrastim (Neupogen), un medicamento que se usa actualmente en personas que han recibido quimioterapia o radioterapia. Este fármaco estimula la multiplicación de glóbulos blancos y puede ayudar a reparar el daño en la médula ósea.

Romurtide, un derivado del dipéptido de muramilo, es conocido para el tratamiento del envenenamiento por radiación a través de Puri et al, Journal of Controlled release, 69, 1, 53-67; Tsubura et al, Arzneim. Forsch/Drug Res.

38(II) Nr 7a; Azuma, Int J Immunopharmac, 14, 3, 487-496; Kawamori et al, Gan to kagaku ryoho. Cancer and Chemotherapy, 21, 7,1057-1062; y Namba et al, Blood, 83, 9, 2480-2488.

La incorporación de dipéptido de muramilo soluble en liposomas o nanopartículas de poli(D,L-láctido) se conoce a través de Turanek, Int J Immunopharmac, 19, 9-10, 611-617; Youan et al, Journal of Controlled Release, 48, 2-3, 339; Morin et al, Int J Immunopharmac, 16, 5-6,451-456 y la solicitud de patente sueca 8803621-5.

Es un objetivo de la presente invención superar o mejorar al menos algunas de las deficiencias del estado anterior de la técnica o proporcionar una alternativa útil.

Resumen de la invención

La presente invención se basa en parte en la sorprendente observación de que un dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula (micropartícula de MDP) es capaz de inducir la síntesis *de novo* de citocinas inmunomoduladoras que se sabe que tienen utilidad clínica para prevenir daños hematopoyéticos o en la médula ósea, o acelerar la restauración de la médula ósea después de la exposición a la radiación, particularmente la radiación ionizante. Además, la micropartícula de MDP se puede funcionalizar con uno o más ligandos capaces de mejorar la síntesis *de novo* de las citocinas inmunomoduladoras, mejorando así la prevención o la reparación del daño debido a la exposición a la radiación como la radiación ionizante o de otro tipo.

Según un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento profiláctico o terapéutico de la exposición a radiación ionizante o el envenenamiento por radiación, que comprende administrar una cantidad eficaz de una micropartícula de MDP o una composición que contenga una micropartícula de MDP a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Concordantemente, en un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un método para acelerar la restauración de la médula ósea en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación, que comprende administrar una cantidad eficaz de una micropartícula de MDP o una composición que contenga una micropartícula de MDP al sujeto que necesita dicho tratamiento.

Concordantemente, en un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona un método para acelerar la mielo-restauración en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación, que comprende administrar una cantidad eficaz de una micropartícula de MDP o una composición que contenga una micropartícula de MDP al sujeto que necesita dicho tratamiento.

Concordantemente, en un cuarto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para estimular la liberación de citocinas en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación, que comprende administrar una cantidad eficaz de una micropartícula de MDP o una composición que contenga una micropartícula de MDP al sujeto que necesita dicho tratamiento.

Concordantemente, en un quinto aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inducir trombocitosis en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación, que comprende administrar una cantidad eficaz de una micropartícula de MDP o una composición que contenga una micropartícula de MDP al sujeto.

La micropartícula de MDP de la presente invención es la definida en la reivindicación 1.

La micropartícula de MDP se puede combinar con al menos un ligando inmunoestimulante, unido o asociado a la micropartícula, que sea capaz de estimular la síntesis *de novo* de citocinas inmunomoduladoras que se sabe que previenen el daño hematopoyético o aceleran la restauración de la médula ósea luego de la exposición a la radiación ionizante. Los ligandos adecuados se pueden elegir entre los ligandos conocidos de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos descritos, como por ejemplo TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, NOD-1, NOD-2 y similares. Otros receptores útiles son bien conocidos en el área y pueden ser identificados fácilmente por los expertos.

Preferentemente, el al menos un ligando inmunoestimulante está particulado en la superficie de la micropartícula de MDP.

Preferentemente, la micropartícula de MDP estimula la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Muy preferentemente, la micropartícula de MDP estimula tanto la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) como la de interleucina-3 (IL-3).

Es una ventaja que la micropartícula de MDP también estimule la producción de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

Se puede usar favorablemente, la micropartícula de MDP o una composición que contenga la micropartícula de MDP para prevenir o mejorar la toxicidad de la radiación asociada a radioterapia como la utilizada en el tratamiento del cáncer. En este caso, la micropartícula de MDP o la composición de ésta se puede administrar hasta 7 días antes de la radioterapia. Más preferentemente, la micropartícula de MDP o la composición de ésta se puede administrar 24 horas antes de la radioterapia. Muy preferentemente, la micropartícula de MDP o la composición de ésta se puede administrar 30 minutos antes de la radioterapia. Por supuesto, los expertos comprenderán que la micropartícula de MDP o una composición de ésta, se puede administrar en cualquier momento antes del comienzo de la radioterapia o durante la radioterapia, según lo exija la situación. También se prevé que la micropartícula de MDP o la composición de ésta se puede administrar a un paciente que ha terminado un ciclo de radioterapia.

Para el tratamiento de la exposición inesperada a radiación, la micropartícula de MDP se administra, preferentemente, inmediatamente después de la exposición a la fuente de radiación. Más preferentemente, la micropartícula de MDP se puede administrar en los al menos 5 minutos siguientes a la exposición. Muy preferentemente, la micropartícula de MDP se puede administrar en un intervalo entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 2 horas después de la exposición a la fuente de radiación.

Alternativamente la micropartícula de MDP se administra en las 24 horas siguientes a la exposición a la radiación.

El envenenamiento por radiación puede ser causado por exposición a radiactividad por inhalación, ingestión o exposición externa directa.

El envenenamiento por radiación puede ser causado por exposición a una fuente de radiación ionizante. La fuente de radiación ionizante puede ser, por ejemplo, partículas alfa, partículas beta, neutrones, rayos X o rayos gamma.

La exposición a la radiación puede ser laboral, pero también puede ser el resultado de un procedimiento terapéutico como, por ejemplo, radioterapia.

De manera ventajosa, la micropartícula de MDP se puede utilizar en combinación con uno o más fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación. El uno o más fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación se pueden elegir entre azul de Prusia insoluble, Ca-DTPA, Zn-DTPA, filgrastim u hormonas y citocinas, por ejemplo, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF y TNF $\alpha$ . Los tratamientos de la presente invención también se pueden combinar con procedimientos como trasplante de médula ósea o transfusión sanguínea.

Preferentemente, la micropartícula de MDP se puede utilizar como co-terapia en combinación con el uno o más fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación. Alternativamente, el uno o más fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación se pueden usar en una terapia coadyudante con la micropartícula de MDP. Dicha terapia puede incluir la administración del fármaco y la micropartícula de MDP, simultánea o secuencialmente. La administración secuencial puede estar separada por cualquier intervalo adecuado de minutos, horas, días o semanas. Se comprenderá que la lista anterior de tratamientos para la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación no es exhaustiva y que se pueden usar otros fármacos como co-terapia o terapia coadyuvante junto con la micropartícula de MDP.

Se comprenderá además que la micropartícula de MDP se puede formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y las formulaciones adecuados forman parte del conocimiento de los expertos en el área o se pueden obtener, por ejemplo, de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>a</sup> Ed, 1995 (Mack Publishing Co. Pennsylvania, Estados Unidos), British Pharmacopoeia, 2000, y similares.

Sin querer vernos constreñidos por ninguna teoría particular sobre cómo funciona la presente invención, se cree que la capacidad de la micropartícula de MDP para tratar la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación se origina en la estimulación demostrable de células del sistema reticuloendotelial para que segreguen citocinas, por ejemplo, GM-CSF, IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ , que se sabe que aceleran la restauración de la médula ósea y la mielo-restauración. Preferentemente, las citosinas se eligen entre IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF o TNF $\alpha$ .

La micropartícula de MDP se puede administrar por vía intravenosa. Alternativamente, la micropartícula de MDP se puede administrar por otras vías, por ejemplo por vía oral, intramuscular, intranasal, por nebulización o mediante administración de polvo seco directamente a las vías respiratorias de un pulmón o a la mucosa nasal. La micropartícula de MDP se puede administrar en una dosis entre aproximadamente 1  $\mu$ g y aproximadamente 150  $\mu$ g/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 1  $\mu$ g y aproximadamente 15  $\mu$ g/kg de peso corporal para la intervención profiláctica y terapéutica a fin de prevenir o mejorar los efectos de la exposición a la radiación o la toxicidad de la radiación. Por supuesto, cualquier dosis dentro de este rango también será útil. Se pueden usar dosis de un rango mayor dependiendo de las necesidades, por ejemplo se pueden usar adecuadamente dosis elegidas en el rango entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 mg/kg de peso

corporal, o cualquier dosis adecuada dentro de este rango. Por supuesto, los expertos en el área comprenderán que la vía de administración y la dosis pueden variar significativamente dependiendo de si la aplicación es terapéutica o profiláctica, así como de la dosis de radiación recibida, el estado del paciente y otros parámetros clínicos medibles como los recuentos de glóbulos y análogos.

5 La radiación que afecta a un sujeto puede ser radiación ionizante pero también puede ser radiación solar o cósmica. Más específicamente, la radiación puede ser ondas de radio, ondas electromagnéticas, rayos infrarrojos, luz visible, rayos ultravioletas como ultravioleta-A, ultravioleta-B o ultravioleta-C, rayos alfa, rayos beta, haces de protones, haces de bariones, rayos X, rayos gamma, haces de electrones, haces de neutrones y análogos. La exposición a la radiación también puede ser causada por radioterapia como la que se usa para el tratamiento del cáncer.

10 En el uso profiláctico, la micropartícula de MDP puede estimular al sistema reticuloendotelial y a otras células de los sistemas inmunitario y endocrino para que segreguen citocinas que pueden proteger a un sujeto de las dosis letales de la radiación. Alternativamente, la micropartícula de MDP se puede usar como protector de la radioterapia durante el tratamiento del cáncer que utiliza radioterapia.

15 Preferentemente, la citocinas se eligen entre GM-CSF, IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ .

20 Según un sexto aspecto, la presente invención proporciona una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para el tratamiento profiláctico o terapéutico de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación en un sujeto expuesto a la radiación o que tiene envenenamiento por radiación.

25 Según un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para acelerar la restauración de la médula ósea en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación.

30 Según un octavo aspecto, la presente invención proporciona una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para acelerar la mielo-restauración en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación.

35 Según un noveno aspecto, la presente invención proporciona una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para estimular la liberación de citocinas en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación.

Según un décimo aspecto, la presente invención proporciona una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para inducir trombocitosis en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación.

40 En el contexto de la presente invención, los términos "MIS", "MIS(416)" y "Micropartícula de MDP" se pueden usar indistintamente.

45 En el contexto de la presente invención, el término "terapéutico" pretende dar entender un tratamiento curativo de una afección existente, y el término "profiláctico" pretende dar entender proteger de, o evitar, la aparición de una enfermedad o afección o que al menos no progrese completamente.

"Restauración de la médula ósea" se refiere en general a la restauración de la función normal de la médula ósea, por ejemplo la restauración de la médula ósea roja (compuesta principalmente por tejido mieloide) y la médula ósea amarilla (compuesta principalmente por adipocitos) es decir, el tejido que llena las cavidades de los huesos y produce nuevos glóbulos sanguíneos. "Mielo-restauración" se refiere a la restauración del tejido dentro de la médula ósea que produce los glóbulos sanguíneos. "Trombocitosis" se refiere al aumento en la producción de plaquetas y/o la reposición del recuento de plaquetas en la sangre. "Reconstitución hematopoyética" se refiere a la reconstitución de los componentes de los glóbulos sanguíneos que derivan de las células madre hematopoyéticas. Las células madre hematopoyéticas residen en la médula (médula ósea) y tienen la capacidad única de originar todos los tipos diferentes de glóbulos sanguíneos maduros. "Eritropoyesis" se refiere al proceso por el cual se producen los glóbulos rojos (eritrocitos). En los humanos adultos, esto ocurre generalmente dentro de la médula ósea. En el contexto de la presente invención, la administración de la micropartícula de MDP en el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación tiene la intención de conservar, acelerar, estimular o inducir los procesos mencionados antes.

60 A menos que el contexto claramente requiera lo contrario, en toda la descripción y las reivindicaciones, las palabras "comprende(n)", "que comprende(n)", "contiene(n)", "que contiene(n)" y similares se deben interpretar en un sentido inclusivo por oposición a un sentido exclusivo o exhaustivo; es decir, en el sentido de "incluye(n), pero no exclusivamente".

Breve descripción de las figuras

Una realización preferida de la invención se describirá ahora, a modo de ejemplo, con relación a los dibujos adjuntos, en los cuales:

- 5 La figura 1 es un gráfico que muestra la producción *in vitro* de GM-CSF luego de la estimulación de sangre entera humana con micropartículas de MDP;
- La figura 2 es un gráfico que muestra la producción *in vitro* de GM-CSF luego de la estimulación de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas con micropartículas de MDP;
- 10 La figura 3 es un gráfico que muestra el recuento de plaquetas en conejos tratados con diferentes dosis de micropartículas de MDP (MIS). El rango normal de plaquetas es de 200 a 650 x 10<sup>9</sup>/L;
- La figura 4 es un gráfico que muestra los niveles de citocinas hematopoyéticas GM-CSF e IL-3 en suero de sangre periférica humana determinados en T = 0, 24 y 48 horas post administración i.v. de 5 mg de micropartículas de MDP;
- La figura 5 es un gráfico que muestra los niveles de citocinas hematopoyéticas GM-CSF e IL-3 en suero de sangre periférica humana determinados en T = 0, 5 y 24 h post administración i.v. de 450 µg de micropartículas de MDP;
- 15 La figura 6 es un gráfico que muestra la producción *in vitro* de IL-1 beta, IL-6 y TNF-alfa luego de la estimulación de PBMC humanas con micropartículas de MDP;
- La figura 7 es un gráfico que muestra la pérdida de peso en ratones de control y ratones tratados con micropartículas de MDP luego de la exposición a una dosis no letal de 7.2 Gy de radiación;
- 20 La figura 8 es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones de control y ratones tratados con micropartículas de MDP luego de la exposición a una dosis no letal de 7.2 Gy de radiación;
- La figura 9 es un gráfico que muestra la pérdida de peso en ratones de control y ratones tratados con micropartículas de MDP luego de la exposición a una dosis letal de 9 Gy de radiación; y
- La figura 10 es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones de control y ratones tratados con micropartículas de MDP luego de la exposición a una dosis letal de 9 Gy de radiación.
- 25 La figura 11 es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones de control y ratones tratados con micropartículas de MDP antes y después de la exposición a una dosis letal de 9 Gy de radiación.
- La figura 12 es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia de ratones de control y ratones tratados con micropartículas de MDP (MIS) antes y después de la exposición de todo el cuerpo a una dosis DL70/30 (7.96 Gy) de radiación gamma.
- 30 La figura 13 es un gráfico que muestra la reconstitución inmunitaria de glóbulos blancos, neutrófilos y plaquetas de ratones de control y ratones tratados con micropartículas de MDP antes y después de la exposición de todo el cuerpo a una dosis DL70/30 (7.96 Gy) de radiación gamma.
- La figura 14 es un gráfico que muestra la reconstitución de glóbulos rojos de ratones de control y ratones tratados con micropartículas de MDP (MIS) antes y después de la exposición de todo el cuerpo a una dosis DL70/30 (7.96 Gy) de radiación gamma.
- 35

Descripción de las realizaciones preferidas

- 40 Previamente, el solicitante dio a conocer un inmunoestimulante en la forma de una micropartícula de un dipéptido de muramilo para el tratamiento del VIH y el carbunco en la patente australiana N° 732809 y la solicitud de patente internacional N° PCT/NZ2008/000131, respectivamente. Sin embargo, el solicitante encontró sorpresiva e inesperadamente que una micropartícula de un dipéptido de muramilo es útil en el tratamiento de la exposición a niveles tóxicos de radiación, tanto cuando se administra antes como después de la exposición a la radiación.
- 45 La presente invención se basa en parte en la sorprendente observación de que un dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula (micropartícula de MDP) es capaz de inducir la síntesis *de novo* de citocinas inmunomoduladoras que se sabe que tienen utilidad clínica en la prevención de daños hematopoyéticos o en la aceleración de la restauración de la médula ósea luego de la exposición a la radiación ionizante. Además, la micropartícula de MDP se puede funcionalizar con uno o más ligandos capaces de aumentar la síntesis *de novo* de
- 50 citocinas inmunomoduladoras, mejorando así la prevención o la reparación del daño debido a la exposición a la radiación ionizante.

La presente divulgación proporciona métodos de tratamiento profiláctico o terapéutico de la exposición a la radiación, particularmente la radiación ionizante, o del envenenamiento por radiación, que comprenden administrar una cantidad eficaz de una micropartícula de MDP o de una composición que contenga una micropartícula de MDP a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

5 Para mejorar la prevención o reparar el daño debido a la exposición a la radiación como la radiación ionizante, la micropartícula de MDP se puede combinar con uno o más ligandos inmunoestimulantes, unidos a, o dentro de, la micropartícula, que sean capaces de estimular la síntesis *de novo* de citocinas inmunomoduladoras que se sabe que previenen el daño hematopoyético o aceleran la restauración de la médula ósea luego de la exposición a la radiación ionizante. Los ligandos adecuados se pueden elegir entre los ligandos conocidos de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos descritos, como por ejemplo TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, NOD-1, NOD-2 y similares. Otros receptores útiles son bien conocidos en el área y pueden ser identificados fácilmente por los expertos. Otros ligandos inmunoestimulantes útiles son bien conocidos en el área y pueden ser fácilmente identificados por los expertos como las proteínas de choque térmico y los antígenos glucolípidicos.

15 Los ligandos inmunoestimulantes, si se usan, pueden estar reticulados en la superficie de, o asociados a, la micropartícula de MDP pero se comprenderá que también se pueden administrar conjuntamente con la micropartícula de MDP.

20 Sin querer vernos constreñidos en lo sucesivo por una teoría o algún mecanismo particular de acción, la micropartícula de MDP y sus composiciones estimulan la producción, entre otras cosas, del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o la producción tanto de GM-CSF como de interleucina-3 (IL-3). Esto es una ventaja, puesto que IL-3 se sabe que actúa cooperativamente con GM-CSF como una citocina hematopoyética. Ventajosamente la micropartícula de MDP también puede estimular la producción de interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ).

25 La micropartícula de MDP también puede estimular la reconstitución hematopoyética aumentando la producción de glóbulos blancos y plaquetas o estimular la eritropoyesis aumentando la producción de glóbulos rojos.

30 Se puede usar favorablemente, la micropartícula de MDP, o una composición que contenga la micropartícula de MDP, para prevenir o mejorar la toxicidad de la radiación asociada a radioterapia. Un experto en el área comprenderá que la micropartícula de MDP o una composición de ésta, cuando se utiliza con ese fin, se puede administrar en cualquier momento antes del comienzo de la radioterapia o durante la misma. La micropartícula de MDP o una composición de ésta se puede administrar hasta 7 días antes de la radioterapia pero en la práctica, y de preferencia, se puede administrar entre 24 horas y 30 minutos antes de la radioterapia. También se prevé que la micropartícula de MDP o la composición de ésta se puede administrar a un paciente que ha terminado un ciclo de radioterapia y logrado los efectos beneficiosos deseados.

40 Para el tratamiento de la exposición inesperada a radiación, la micropartícula de MDP se administra, preferentemente, inmediatamente después de la exposición a la fuente de radiación. La micropartícula de MDP se puede administrar en un intervalo entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 2 horas después de la exposición a la fuente de radiación, o alternativamente 24 horas después de la exposición. De preferencia, la micropartícula de MDP se puede administrar en los 5 minutos siguientes a la exposición.

45 El envenenamiento por radiación puede ser causado por exposición a radiactividad o una fuente de radiación ionizante por inhalación, ingestión o exposición externa directa. La fuente de radiación ionizante puede ser, por ejemplo, partículas alfa, partículas beta, neutrones, rayos X o rayos gamma.

50 La exposición a la radiación puede ser laboral, pero también puede ser el resultado de un procedimiento terapéutico como, por ejemplo, la radioterapia utilizada en el tratamiento del cáncer.

55 De manera ventajosa, la micropartícula de MDP se puede utilizar en combinación con uno o más fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación. Dichos otros fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación se pueden elegir entre azul de Prusia insoluble, Ca-DTPA, Zn-DTPA, filgrastim, u hormonas y citocinas, por ejemplo, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF y TNF $\alpha$ . Los tratamientos de la presente invención también se pueden combinar con procedimientos como trasplante de médula ósea y transfusión sanguínea.

60 Alternativamente, el uno o más fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación se pueden usar en una terapia coadyudante con la micropartícula de MDP. Dicha terapia puede incluir la administración del fármaco y la micropartícula de MDP simultánea o secuencialmente. La administración secuencial puede estar separada por cualquier intervalo adecuado de minutos, horas, días o semanas. Se comprenderá que la lista anterior de tratamientos para la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación no es exhaustiva y que se pueden usar otros fármacos como co-terapia o terapia coadyuvante junto con la micropartícula de MDP.

Se comprenderá además que la micropartícula de MDP se puede formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y las formulaciones adecuados forman parte del conocimiento de los expertos en el área o se pueden obtener, por ejemplo, de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Ed, 1995 (Mack Publishing Co. Pennsylvania, Estados Unidos), British Pharmacopoeia, 2000, y similares.

La micropartícula de MDP de la presente invención es resistente al tratamiento con pepsina y extremos de pH, y a condiciones de desnaturalización, como por ejemplo, el tratamiento con pepsina a pH 3.5, o pH menor de 1 y mayor de 11 a temperatura ambiente, o condiciones de desnaturalización en urea 6 M o clorhidrato de guanidina 6 M.

Sin querer vernos constreñidos por ninguna teoría particular sobre cómo funciona la presente invención, se cree que la capacidad de la micropartícula de MDP para tratar la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación se origina en la estimulación demostrable de células del sistema reticuloendotelial para que segreguen citocinas, por ejemplo, GM-CSF, IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ , que se sabe que aceleran la restauración de la médula ósea y la mielo-restauración.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona métodos de aceleración de la restauración de la médula ósea, de aceleración de la mielo-restauración y/o de estimulación de la liberación de citocinas en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación, que comprenden administrar una cantidad eficaz de una micropartícula de MDP al sujeto que necesita dicho tratamiento.

Preferentemente, las citosinas se eligen entre IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF o TNF $\alpha$ . La micropartícula de MDP se puede administrar por vía intravenosa pero también se puede administrar por otras vías, por ejemplo por vía oral, intramuscular, intranasal, por nebulización o mediante administración de polvo seco directamente a las vías respiratorias de un pulmón o a la mucosa nasal. La micropartícula de MDP se puede administrar en una dosis entre 1  $\mu$ g y 150  $\mu$ g/kg de peso corporal para la intervención profiláctica y terapéutica a fin de prevenir o mejorar los efectos de la exposición a la radiación. Habitualmente, la micropartícula de MDP o su composición se puede administrar en una dosis entre aproximadamente 1  $\mu$ g y aproximadamente 150  $\mu$ g/kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 1  $\mu$ g y aproximadamente 10  $\mu$ g/kg de peso corporal para la intervención profiláctica y terapéutica a fin de prevenir o mejorar los efectos de la exposición a la radiación o la toxicidad de la radiación. La micropartícula de MDP también se puede administrar en dosis intermedias elegidas entre aproximadamente 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o 150  $\mu$ g/kg de peso corporal. También se pueden usar dosis en un rango mayor dependiendo de las necesidades, por ejemplo dosis elegidas entre aproximadamente 1, 3, 5, 7, 10, 13, 15, 17 o 20 mg/kg de peso corporal. Por supuesto, los expertos en el área comprenderán que la vía de administración y la dosis pueden variar significativamente dependiendo de si la aplicación es terapéutica o profiláctica, así como de la dosis de radiación recibida, el estado del paciente y otros parámetros clínicos medibles como los recuentos de glóbulos y similares. El tratamiento puede comprender una única dosis diaria, múltiples dosis diarias o dosis administradas con menos frecuencia como día por medio, semanalmente o mensualmente.

Las composiciones de la presente invención son eficaces para el tratamiento (profiláctico o terapéutico, es decir preventivo o curativo) de la exposición a diferentes fuentes de radiación, como por ejemplo, radiación ionizante, radiación solar, radiación cósmica, fuentes terrestres externas y radón. La radiación ionizante existe por ejemplo, como partículas alfa, partículas beta, neutrones, y en algunos casos, fotones. Los rayos ultravioleta, los rayos X y los rayos gamma son algunos ejemplos de formas conocidas de radiación ionizante. Varias fuentes de radiación ionizante incluyen, pero no exclusivamente, materiales radiactivos, tubos de rayos X y aceleradores de partículas. La exposición a radiaciones ionizantes puede causar daño a los tejidos vivos y puede producir enfermedad por radiación y quemaduras cutáneas. Dosis suficientemente altas de radiación ionizante también pueden causar el desarrollo de cánceres y tumores y en casos extremos pueden incluso provocar la muerte. Se demostró que las dosis bajas causan daño genético al romper una o ambas hebras del ADN o formar radicales libres. La radiación ionizante también se puede usar con fines médicos por ejemplo como parte del tratamiento del cáncer para controlar las células malignas. "Radiación solar" describe la radiación visible o cercana a la visible (ultravioleta e infrarroja cercana) emitida por el sol. El componente ionizante de la radiación solar es insignificante en comparación con otras formas de radiación sobre la superficie de la Tierra. Sin embargo, la exposición excesiva a la parte ultravioleta de la radiación de la luz solar ha sido vinculada a muchos tipos de cáncer de piel. Además, las quemaduras solares pueden causar inflamación leve de la piel y la exposición ultravioleta puede acelerar el envejecimiento de la piel.

Ejemplos más específicos incluyen los rayos cósmicos, las ondas de radio, las ondas electromagnéticas, los rayos infrarrojos, la luz visible, los rayos ultravioleta (ultravioleta-A, ultravioleta-B y ultravioleta-C), los rayos alfa, los rayos beta, los haces de protones, los haces de bariones, los rayos X, los rayos gamma, los haces de electrones, los haces de neutrones y similares. Normalmente, los tipos de radiación en la presente invención son aquellos contra los cuales es necesaria la protección, por ejemplo, los rayos cósmicos, las ondas electromagnéticas, ultravioleta-A, ultravioleta-B, los rayos alfa, los rayos beta, los haces de protones, los haces de bariones, los rayos X, los rayos gamma, los haces de electrones y los haces de neutrones.



En el uso profiláctico, la micropartícula de MDP puede estimular al sistema reticuloendotelial para que segregue citocinas que pueden proteger a un sujeto contra dosis letales de radiación. Alternativamente, la micropartícula de MDP se puede usar como protector contra la radioterapia durante el tratamiento del cáncer que utiliza radioterapia.

Preferentemente, las citocinas se eligen entre GM-CSF, IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ . Esto es ventajoso, porque se sabe que estas citocinas confieren radioprotección sinérgica a través de sus mecanismos de acción individuales y complementarios.

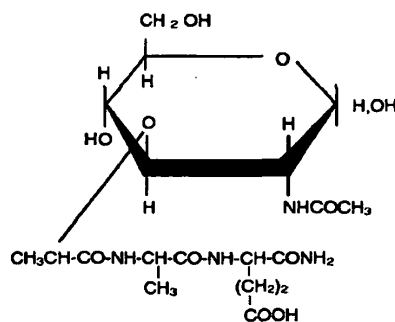
Por lo tanto, la presente invención también proporciona métodos para inducir trombocitosis en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación, que comprende administrar una cantidad eficaz de una micropartícula de MDP al sujeto.

Las realizaciones preferidas de la invención se describirán ahora por referencia a los ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 - Preparación de una micropartícula de MDP

Una repetición múltiple del dipéptido de muramilo (MDP) aislado de *Propionibacterium acini*; formó la estructura central del complejo micropartícula de MDP-vehículo de este ejemplo. La composición química de la subunidad monómera preferida es la siguiente:



El MDP tiene propiedades inmunoestimulantes bien conocidas, que han sido evaluadas exhaustivamente en estudios diseñados para determinar su efecto sobre el aumento de la función inmunitaria. Hasta la fecha, tanto el MDP aislado de fuentes naturales como el MDP sintético se han asociado a una significativa toxicidad cuando se administran a mamíferos. Esta toxicidad ha limitado la eficacia del MDP como adyuvante.

En este documento se proporciona un método para el aislamiento de MDP sin componentes tóxicos. Se cultivó *Propionibacterium acnes* hasta una fase de crecimiento semi-estacionaria y se lavó para eliminar los contaminantes del origen del cultivo bacteriano empleando técnicas bien conocidas por los expertos. Los componentes hidrófobos contenidos en las paredes celulares y el citoplasma se extrajeron secuencialmente por lavados sucesivos con concentraciones crecientes de etanol/isopropanol/agua (10%: 10%: 80%, 25%: 25%: 50% y 40%: 40%: 20%) a temperaturas elevadas. Después se eliminó el alcohol isopropílico con lavados sucesivos con concentraciones decrecientes (80%, 50%, 40% y 20%) de etanol a temperaturas elevadas. La micropartícula de MDP resultante se suspendió entonces en 20% de etanol y su concentración se midió relacionando su absorbancia a 540 nm con la absorbancia de los patrones de turbidez. La concentración de la micropartícula de MDP se ajustó a 10 mg/ml para el almacenamiento y uso posterior.

El análisis de esta preparación mostró al dipéptido de muramilo muy reticulado con un tamaño de micropartícula en el rango de 0.05 a 0.2 micrómetros. La micropartícula de MDP contiene ácido murámico con dipéptido L-alanina-D-isoglutamina unido por amino como el componente bioactivo. Dicha micropartícula se puede aislar de fuentes naturales, como antes, o sintetizar usando procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, Liu G.; Zhang S.-D.; Xia S.-Q.; Ding Z.-K. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 10 (12), 2000, pp. 1361-1363(3); Schwartzman S.M., Ribí E., Prep Biochem. 1980; 10(3): 255-67; Ohya et al. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 1993; 8: 351-364). Las micropartículas de MDP generadas por los métodos de la presente pueden tener una amplia gama de tamaños (por ejemplo, 0.01-2.0 micrómetro), pero el tamaño preferido está en el rango de 0.05-0.2 micrómetros.

#### Ejemplo 2 - Unión covalente de ligandos a la micropartícula de MDP

La unión covalente de un ligando, si se usa, a la micropartícula de MDP se puede hacer a través de reticuladores bifuncionales o al producto de la oxidación del aldehído de la porción carbohidrato según lo dado a conocer en estos

ejemplos como se describe en Current Protocols In Immunology; Series Editor: Richard Coico (Cornell University) Published by John Wiley & Sons, Inc.

5 La micropartícula de MDP (20 mg) se sedimenta por centrifugación en 20% de etanol, se resuspende y se lava exhaustivamente con agua. Después la micropartícula de MDP se sedimenta y resuspende a una concentración de 50 mg de micropartícula de MDP/ml en metaperyodato de sodio (0.5 M) y se lleva a cabo una reacción de oxidación durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de la activación con metaperyodato de sodio, la suspensión de micropartícula de MDP se sedimenta por centrifugación, se resuspende y se lava exhaustivamente con agua. La concentración de metaperyodato de sodio y el tiempo de reacción se pueden variar para regular el número de sitios  
10 activados producidos dentro de la micropartícula de MDP durante la oxidación. Una micropartícula de MDP activada debe reaccionar con, y unirse covalentemente a, al menos una molécula del ligando en cuestión por cada micropartícula de MDP, preferentemente 10-100 moléculas del ligando en cuestión por cada micropartícula de MDP y muy preferentemente 100 a 1000 péptidos en cuestión por cada micropartícula de MDP. Para una preparación de la micropartícula de MDP muy activada, se utiliza una concentración final de metaperyodato de sodio de 0.5 M y se  
15 lleva a cabo la reacción de oxidación durante una hora.

Después de la oxidación del metaperyodato de sodio, se sedimenta la micropartícula de MDP y se lava exhaustivamente para eliminar el metaperyodato de sodio. Entonces la micropartícula de MDP activada se resuspende en el ligando deseado (por ejemplo TLR9 o NOD2 a >1 mg/ml en una relación 20:1 p/p) en tampón de bicarbonato de sodio (0.1 M pH 9.5) y se incuba (temperatura ambiente) durante 18 a 24 horas. Los reactivos se centrifugan y se reduce el sedimento que ahora contiene los ligandos unidos a la micropartícula de MDP a través de una base de Schiff intermediaria para formar un enlace covalente estable entre la micropartícula de MDP y los ligandos. Se pueden emplear numerosos reductores, y borohidruro de sodio, es un ejemplo de un reductor utilizado habitualmente para este propósito. A continuación de la reducción de la base de Schiff, el conjugado micropartícula  
20 de MDP-ligando, se sedimenta, se lava y se resuspende en el tampón de vacuna deseado a la concentración de ligando deseada.

Cuando se desea la administración de más de un ligando, se puede preparar un cóctel de conjugados micropartícula de MDP-ligando mezclando conjugados individuales en las proporciones de mezcla que optimicen la eficacia de cada ligando introducido en el cóctel. En esta configuración, se dispone de suficiente ligando en cada conjugado de micropartícula (100-1000 ligandos/micropartícula) para mejorar las respuestas celulares por una única célula  
30 respondedora. La actividad del ligando en cuestión se puede optimizar ajustando tanto la cantidad de ligandos en cuestión por micropartícula de MDP-vehículo como, cuando se desee, la relación de los ligandos dentro de un cóctel para lograr la respuesta celular deseada.

35 Con múltiples repeticiones de dipéptido de muramilo, la unión del ligando en cuestión a grupos aldehído se puede producir por oxidación suave de residuos de azúcar con, por ejemplo, metaperyodato de sodio luego de la reducción suave con borohidruro de sodio y análogos. La base de Schiff intermediaria se convierte entonces en un enlace covalente estable. El número de ligandos por micropartícula se puede controlar variando las condiciones de oxidación y se puede cuantificar según sea necesario empleando un trazador radiactivo. Estos métodos son bien conocidos en el área (por ejemplo, Current Protocols in Immunology; Series Editor: Richard Coico (Cornell University) Published by John Wiley & Sons, Inc.).

45 Ejemplo 3 - Producción *in vitro* de GM-CSF luego de la estimulación de sangre humana entera con micropartículas de MDP.

Se demostró que las micropartículas de MDP inducen la secreción de GM-CSF en sangre entera diluida (Figura 1). Se determinaron los niveles de GM-CSF a T = 24 y 88 horas post estimulación *in vitro* con 20 µg/ml de micropartículas de MDP usando la metodología estándar de citometría de flujo, cytometric bead array (CBA),  
50 (Becton Dickinson, San Jose, Estados Unidos). Se incluyeron para comparación PMA (25 nM) y ionomicina (1µg/ml).

Ejemplo 4 - Producción *in vitro* de GM-CSF luego de la estimulación de PBMC humanas con micropartículas de MDP.

55 Se demostró que las micropartículas de MDP inducen la secreción de GM-CSF en ensayos de estimulación de PBMC aisladas (Figura 2). Se determinaron los niveles de GM-CSF a T = 24 y 72 horas post estimulación *in vitro* con 5 o 1 µg/ml de micropartículas de MDP o con 108 partículas/ml de HKSA (*Staphylococcus aureus* destruido por calor) para comparar.

60 Ejemplo 5 - Recuento de plaquetas en conejos después de la administración i.v. de 500 µg de micropartículas de MDP.

Se demostró que las micropartículas de MDP inducen trombocitosis en conejos, siete días después de la administración de un bolo i.v. de 500 µg de micropartículas de MDP a los conejos (Figura 3). Este tratamiento causó

un aumento de 73% en el recuento de plaquetas ( $p = 0.03$  frente a los controles sin tratar).

Ejemplo 6 - Niveles de citocinas hematopoyéticas GM-CSF y IL-3 en suero de sangre periférica humana después de la administración de 5 mg o 450  $\mu$ g de micropartículas de MDP.

5 Se encontró que el tratamiento con micropartículas de MDP producía un aumento en los niveles de GM-CSF, así como de IL-3, otra citocina hematopoyética que se sabe que actúa cooperativamente con GM-CSF, en el suero de 2 pacientes. Un paciente (Figura 4) recibió una dosis de 5 mg de micropartículas de MDP (administrada en 0.2 mL de solución salina i.v.) Se determinaron los niveles de citocinas hematopoyéticas a T = 0, 24 y 48 h post administración i.v. de 5 mg de micropartículas de MDP usando metodología estándar de citometría de flujo, cytometric bead array (CBA), (Becton Dickinson, San Jose, Estados Unidos)

15 Un segundo paciente (Figura 5) recibió 450  $\mu$ g de micropartículas de MDP (i.v.). Se determinaron los niveles de citocinas hematopoyéticas a T = 0, 5 y 24 h post administración i.v. de 450  $\mu$ g de micropartículas de MDP.

Ejemplo 7 - Producción *in vitro* de IL-1 beta, IL-6 y TNF-alfa luego de la estimulación de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas con micropartículas de MDP.

20 Basándose en datos de absorción de un subconjunto de células *in vitro* y el análisis de la inducción de una amplia gama de citocinas *in vitro* e *in vivo*, pero sin querer vernos constreñidos por ningún mecanismo o teoría particular, los datos indican que las micropartículas de MDP actúan estimulando las células del sistema reticuloendotelial para que segreguen citocinas que pueden acelerar la restauración de la médula ósea o pueden proteger de dosis letales de radiación. Además de la producción de GM-CSF, asociada a mielo-restauración, las micropartículas de MDP también han demostrado inducir la producción de IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ , citocinas que se sabe que confieren radioprotección sinérgica (Figura 6). Se determinaron los niveles de las citocinas a T = 24 y 72 horas post estimulación *in vitro* con 20  $\mu$ g/ml de micropartículas de MDP usando metodología estándar de citometría de flujo, cytometric bead array (CBA), (Becton Dickinson, San Jose, Estados Unidos).

30 Ejemplo 8 - Uso de micropartículas de MDP como un radioprotector cuando se administran después de la exposición a la radiación letal y subletal.

35 Se realizaron dos experimentos utilizando diferentes dosis de radiación, 7.2 Gy y 9.0 Gy de radiación gamma de una fuente de cobalto 60. Esta fuente y tipo de radiación sirve como una fuente genérica útil y conveniente de radiación que representa adecuadamente y ejemplifica otras fuentes de radiación que se pueden utilizar eficazmente o que se pueden encontrar en el ambiente o usar en terapia o para otros fines.

40 En ambos experimentos, 24 ratones C57B1/6 se irradiaron en todo el cuerpo el día 0 y se dividieron en grupos de 12 controles y 12 ratones experimentales. En el día +1, se les inyectó solución salina o micropartículas de MDP por vía intravenosa (250  $\mu$ g de ambos, en un volumen de 250  $\mu$ L). Esto se repitió en el día +4, pero por inyección subcutánea (100  $\mu$ g de ambos - en un volumen de 500  $\mu$ L).

45 El tratamiento con micropartículas de MDP se administró el día +1 para cumplir con las restricciones impuestas por las directrices de los National Institutes of Health con respecto a un agente para usar en una exposición accidental o un ataque terrorista.

#### Experimento 1

50 Veinticuatro ratones C57B1/6 se dividieron en dos grupos de 12 ratones de control y 12 ratones tratados con micropartícula de MDP. Luego se administró una dosis subletal de 7.2 Gy de radiación el día 0. Los ratones se pesaron los días 0, 4, 8, 10, 11, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28 y 30.

55 Volviendo a la figura 7, se pueden ver los pesos de los ratones tratados con micropartícula frente a los ratones de control. Es evidente que el tratamiento con micropartículas de MDP ha evitado la pérdida de peso en comparación con los ratones de control después de la exposición a una dosis no letal de radiación. La figura 8 muestra las tasas de supervivencia de los ratones de control y los ratones tratados con micropartículas de MDP después de la exposición a la dosis no letal de radiación. Los ratones tratados con micropartículas de MDP tienen una mayor tasa de supervivencia que los ratones de control; 100% de los ratones tratados con micropartícula de MDP sobrevivieron.

#### Experimento 2

60 Como en el experimento 1, veinticuatro ratones C57B1/6 se dividieron en dos grupos de 12 ratones de control y 12 ratones tratados con micropartícula de MDP. Se les aplicó una dosis letal de 9 Gy de radiación el día 0. Los ratones se pesaron los días 0, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 26 y 28, y se controló su supervivencia (Figura 8). La figura 9 muestra el promedio de los pesos de los ratones vacunados frente a los ratones

de control. Es evidente que el tratamiento con micropartículas de MDP ha evitado la pérdida de peso corporal en comparación con los ratones de control después de la exposición a la dosis letal de radiación

5 La figura 10 muestra las tasas de supervivencia de los ratones tratados con micropartícula de MDP y los ratones de control irradiados con una dosis letal de radiación. Los resultados muestran claramente que los ratones tratados con micropartículas de MDP tienen una tasa de supervivencia mayor que los ratones de control. Los 12 ratones de control murieron en los 19 días siguientes a la exposición a la radiación letal.

10 Ejemplo 9 - Uso de micropartículas de MDP como un radioprotector cuando se administran antes así como a continuación de la exposición a la radiación

#### Experimento 1

15 Se pesaron ratones CD2F1 machos, (12 a 14 semanas de vida). Los animales de bajo y alto peso se excluyeron. Los animales restantes se asignaron al azar a grupos de tratamiento (16 animales por grupo). Los animales recibieron alimentación (Harlan, IN) y agua acidificada (pH 2.5-3.0) a voluntad. Una alícuota de la solución madre de micropartículas de MDP (5 mg/mL) se diluyó en solución salina el día de la inyección para administrar 10 mg/kg en 0.1 mL/ratón por vía *i.p.* (intraperitoneal). Los animales experimentales recibieron 9.0 Gy de irradiación en todo el cuerpo a una intensidad de la dosis de 0.6 Gy por/min de radiación gamma de cobalto 60. A los ratones tratados con fármaco se les administraron 10 mg/kg de micropartículas de MDP *i.p.*, a - 24 horas + 1 hora en relación con el tiempo de irradiación de todo el cuerpo.

25 La figura 11 muestra claramente que el tratamiento previo de los ratones 24 horas antes de la exposición a la radiación aumentó significativamente su supervivencia. Los ratones que no fueron tratados con micropartículas de MDP mostraron una tasa de supervivencia de 8% a los 30 días post exposición a la radiación, mientras que los ratones que fueron tratados con micropartículas de MDP *ip* mostraron una tasa de supervivencia de 38%.

#### Experimento 2

30 Se pesaron ratones C57BL/6 (10-12 semanas de vida) y se determinó el peso promedio para machos y hembras. Los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento (30 por grupo). Los animales recibieron alimentación (Harlan 2018 C) y agua acidificada (pH 2.4-3.0) a voluntad. Se suministraron micropartículas de MDP (MIS416) en una concentración de 1 mg/mL en solución salina estéril. Todos los ratones hembra se dosificaron basándose en el peso promedio de las hembras, y todos los machos se dosificaron basándose en el peso promedio de los machos. 35 Se administraron micropartículas de MDP por inyección *i.p.* Se realizó el siguiente programa de administración:

- a) 1 dosis, 12.5 mg/kg (250 µg/20 g ratón) 14 días + 6 h antes de la radiación
- b) 1 dosis, 5 mg/kg ( 100 µg/20 g ratón) 24 + 4 h antes de la radiación
- c) 1 dosis, 5 mg/kg ( 100 µg/20 g ratón) 24 ± 4 h después de la radiación
- 40 d) 2 dosis, 5 mg/kg ( 100 µg/20 g ratón) 24 ± 4 h antes y 24 ± 4 h después de la radiación

Se administró una dosis subletal de radiación equivalente a una DL70/30 (7.96 Gy) como una única dosis uniforme en todo el cuerpo de radiación gamma de una fuente de radiación de <sup>137</sup>Cs a una tasa de exposición de 0.65-0.69 Gy/minuto.

45 Se llevó a cabo el recuento de glóbulos (RG) mediante frotis periféricos y diferenciales en 5 ratones/grupo seleccionados al azar en jaulas separadas los días 10 y 22. También se realizaron recuentos de glóbulos (RG) en 4 ratones de control, de edad comparable, no irradiados, como controles hematológicos.

50 Los resultados en la figura 12 muestran claramente que la supervivencia a los treinta días de ratones expuestos a 796 cGy de radiación y tratados con una dosis de 5 mg/kg de micropartículas de MDP (MIS416) (100 µg /20 de ratón), 24 horas antes o 24 horas después de la irradiación, o dos dosis 24 horas antes, así como 24 horas después de la irradiación, aumentó significativamente en comparación con los controles (supervivencia = 100%, 96.7%, 100% y 50%, respectivamente).

55 En la figura 13 los resultados para el RG del subconjunto de los leucocitos (GB) muestra que la recuperación de los glóbulos blancos (GB), los neutrófilos y las plaquetas aumentó significativamente en los días 10 y 22 en el día -1 y el día -1, +1 en los grupos tratados con micropartículas de MDP en comparación con los controles.

60 En la figura 14, los glóbulos rojos (GR) aumentaron significativamente el día 22, el día-1 y el día -1, +1 en los grupos tratados con micropartículas de MDP en comparación con los controles.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula (micropartícula de MDP) o una composición que contiene una micropartícula de MDP y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación.
- 10 2. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde la micropartícula de MDP o la composición que contiene la micropartícula de MDP acelera la restauración de la médula ósea en un sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación.
- 15 3. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con la reivindicación 1, donde la micropartícula de MDP o la composición que contiene la micropartícula de MDP acelera la mielo-restauración y/o induce trombocitosis en el sujeto expuesto a radiación o que tiene envenenamiento por radiación.
- 20 4. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la exposición a la radiación es exposición a radiación ionizante o donde el envenenamiento por radiación es causado por radiación ionizante.
- 25 5. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la micropartícula de MDP o la composición que contiene la micropartícula de MDP se administra por vía intravenosa, oral, intramuscular, intranasal, por nebulización o por administración de polvo seco directamente a las vías respiratorias de un pulmón o a la mucosa nasal.
- 30 6. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la micropartícula de MDP o la composición que contiene la micropartícula de MDP se administra a una dosis elegida del rango de dosificación de 1 µg a 150 µg/kg de peso corporal, o 1 µg a 15 µg/kg de peso corporal; o entre 1, 5, 10, 15 o 20 mg/kg de peso corporal, en una sola dosis o en varias dosis.
- 35 7. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la exposición a la radiación es causada por radioterapia.
- 40 8. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con la reivindicación 7, donde la micropartícula de MDP o la composición que contiene una micropartícula de MDP se administra al menos 30 minutos antes de la radioterapia o en un intervalo entre al menos 24 horas y 7 días antes de la radioterapia.
- 45 9. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con la reivindicación 7, donde la micropartícula de MDP o la composición que contiene una micropartícula de MDP se administra en cualquier momento antes del comienzo de la radioterapia, en el momento de comenzar la radioterapia, durante la radioterapia o luego de completar un ciclo de radioterapia.
- 50 10. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la micropartícula de MDP se administra inmediatamente después de la exposición a la radiación, o en un intervalo entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 2 horas, o al menos en las 24 horas siguientes a la exposición a la radiación.
- 55 11. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación es causado por exposición a radiactividad por inhalación, ingestión o exposición externa directa.
- 60 12. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la micropartícula de MDP se combina con al menos un ligando inmunoestimulante, unido o asociado a la micropartícula, que es capaz de estimular citocinas inmunomoduladoras, y donde el ligando se elige entre los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, NOD-1 o NOD-2.
13. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la micropartícula de MDP estimula la producción de:
- (i) el factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF);

- (ii) GM-CSF e interleucina-3 (IL-3);
- (iii) interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ );
- (iv) GM-CSF, IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ ; o
- (v) GM-CSF, IL-1, IL-3, IL-6 y TNF $\alpha$ .

5 14. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la micropartícula de MDP estimula la reconstitución hematopoyética aumentando la producción de glóbulos blancos y plaquetas, y/o estimula la eritropoyesis aumentando la producción de glóbulos rojos.

10 15. Una micropartícula de MDP o una composición que contiene una micropartícula de MDP para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la micropartícula de MDP se usa en combinación con uno o más fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación, donde el uno o más fármacos para el tratamiento de la exposición a la radiación o el envenenamiento por radiación se elige entre azul de Prusia insoluble, Ca-DTPA, Zn-DTPA, filgrastim, trasplante de médula, transfusión sanguínea u hormonas y  
15 citocinas, y donde las citocinas se eligen entre IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF o TNF $\alpha$ .

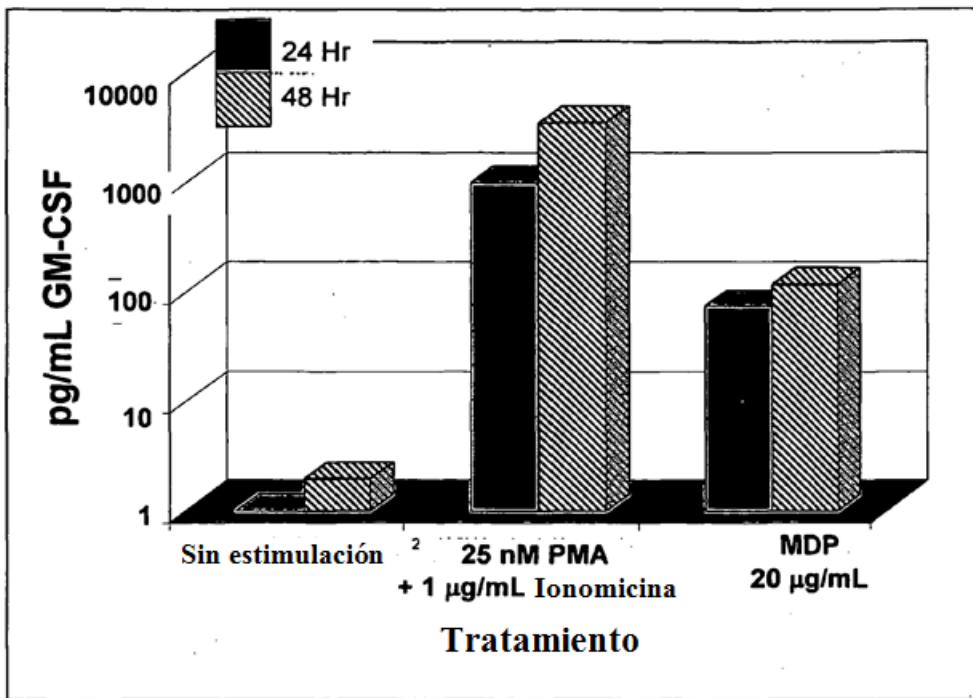


Figura 1

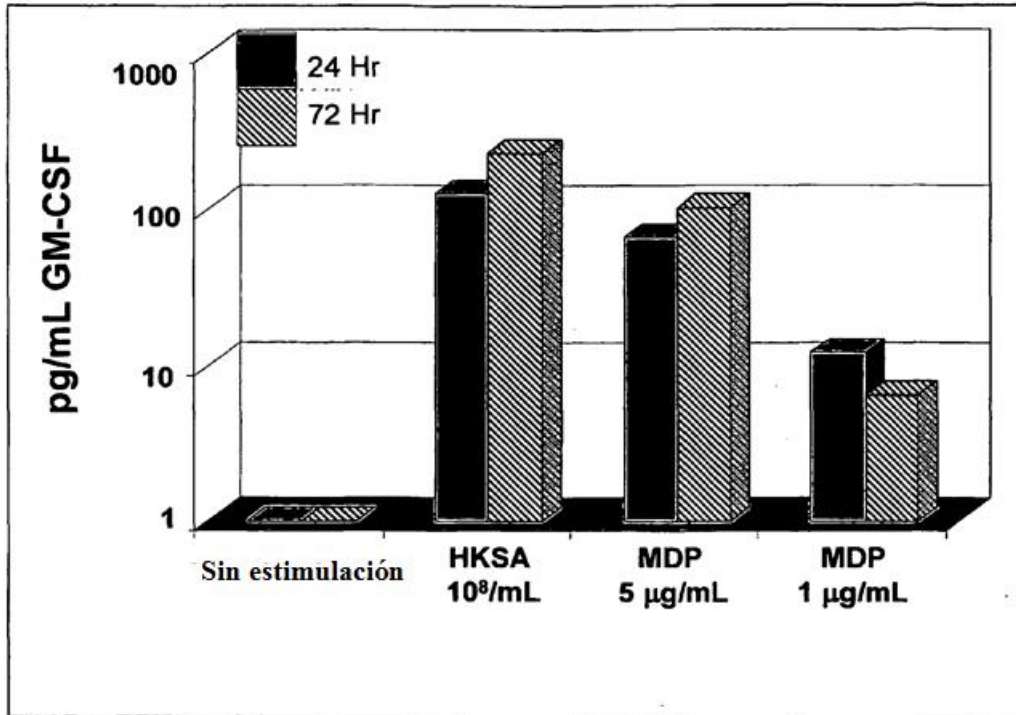


Figura 2



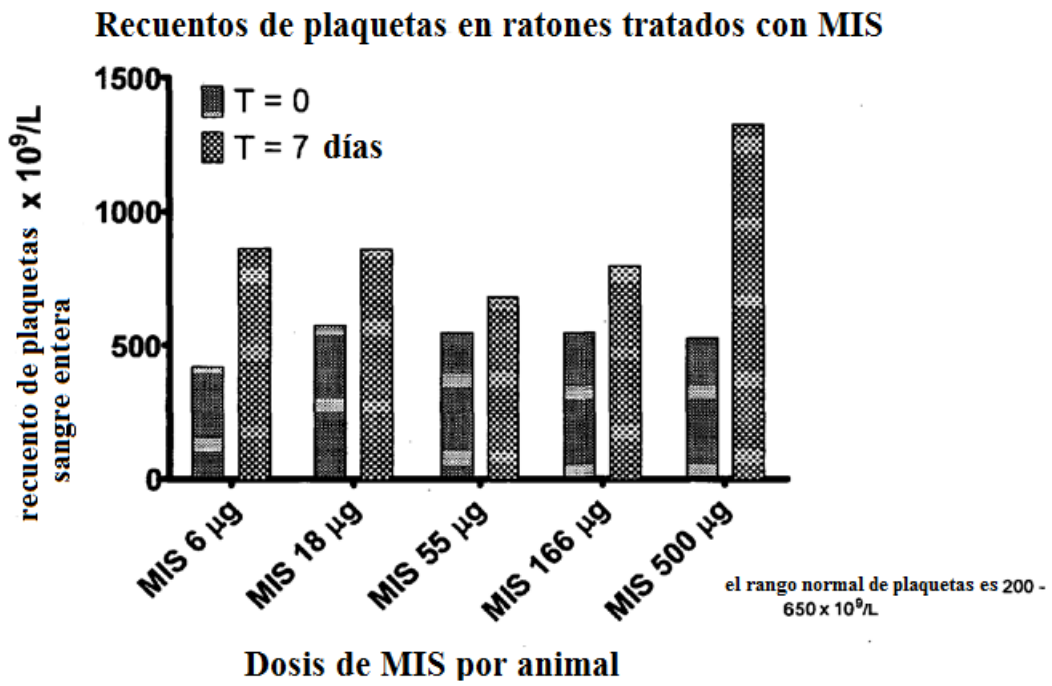


Figura 3

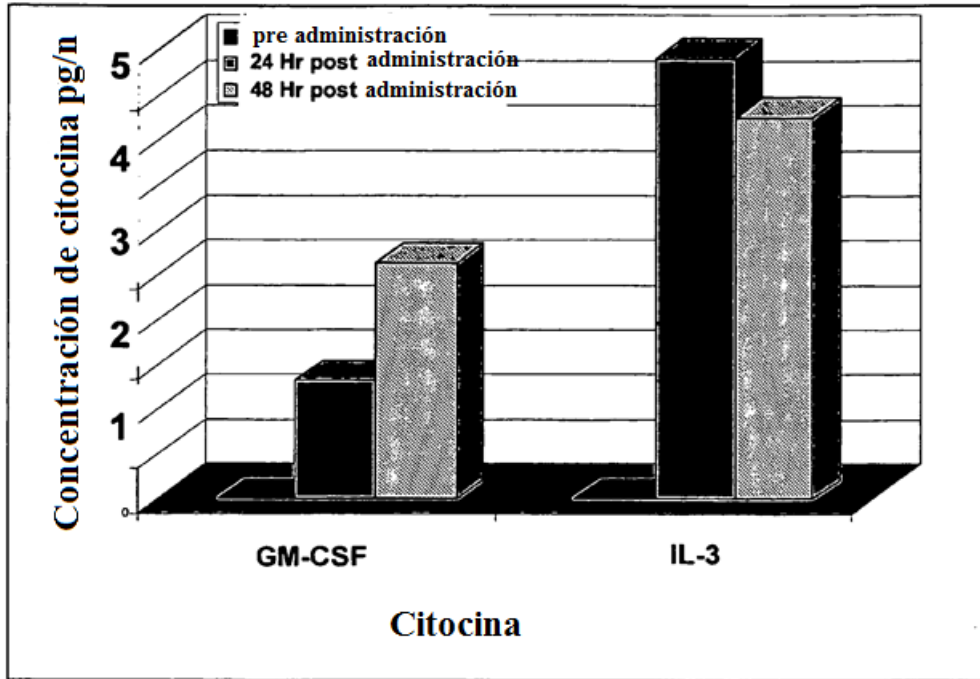


Figura 4

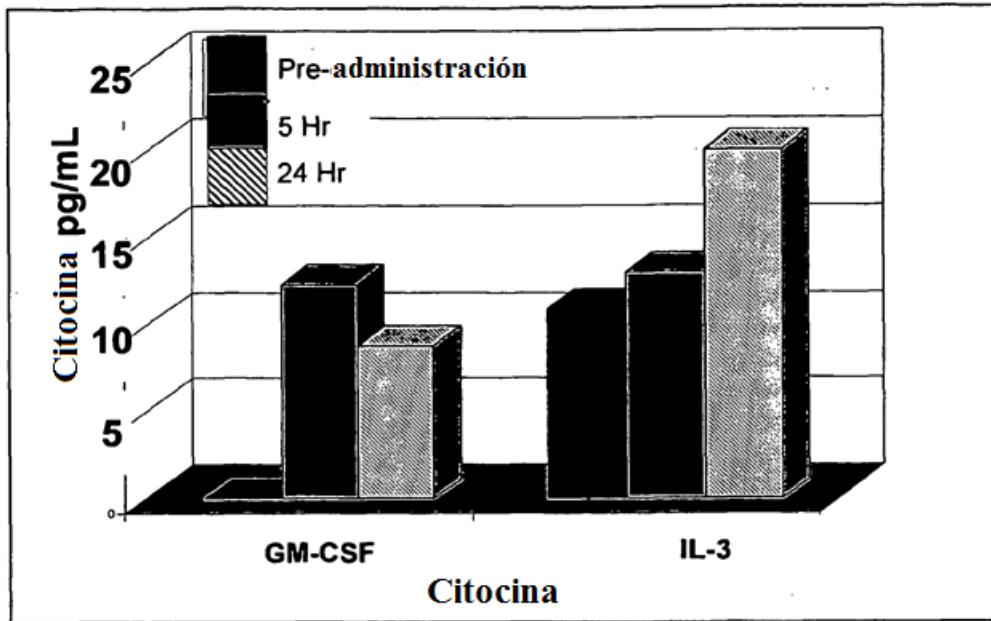


Figura 5

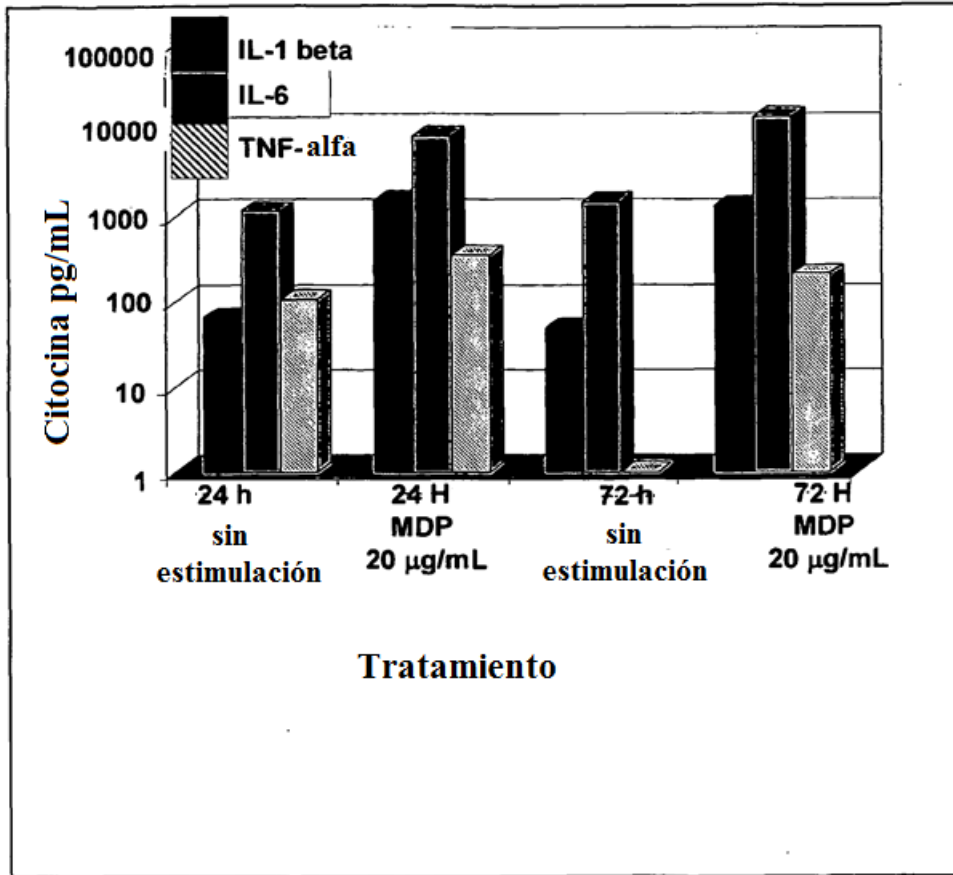


Figura 6

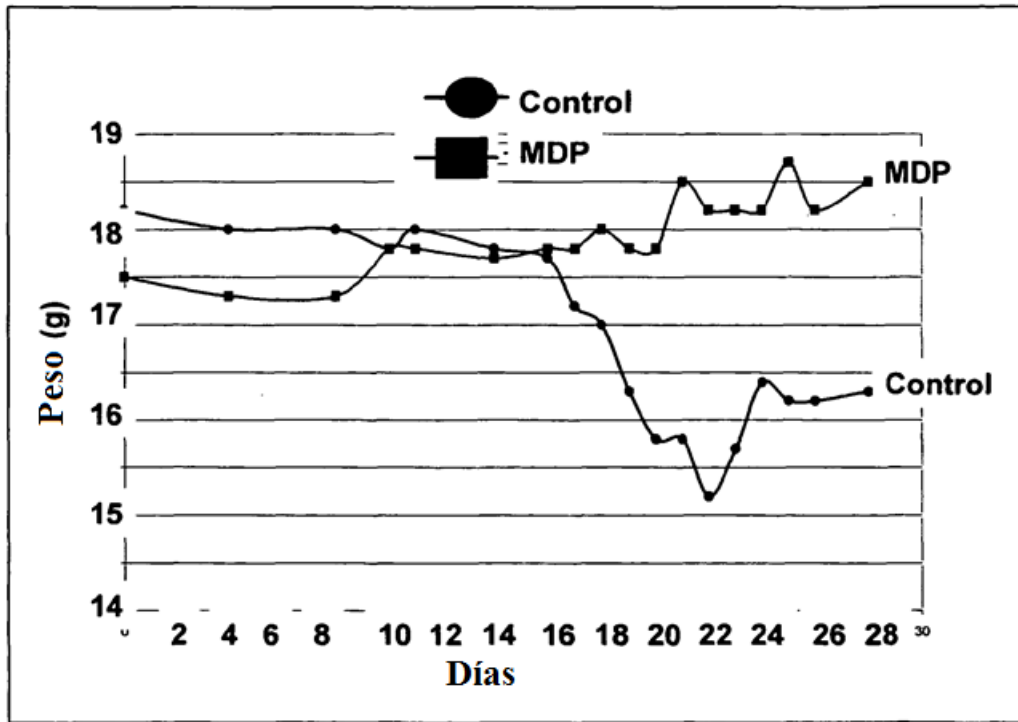


Figura 7

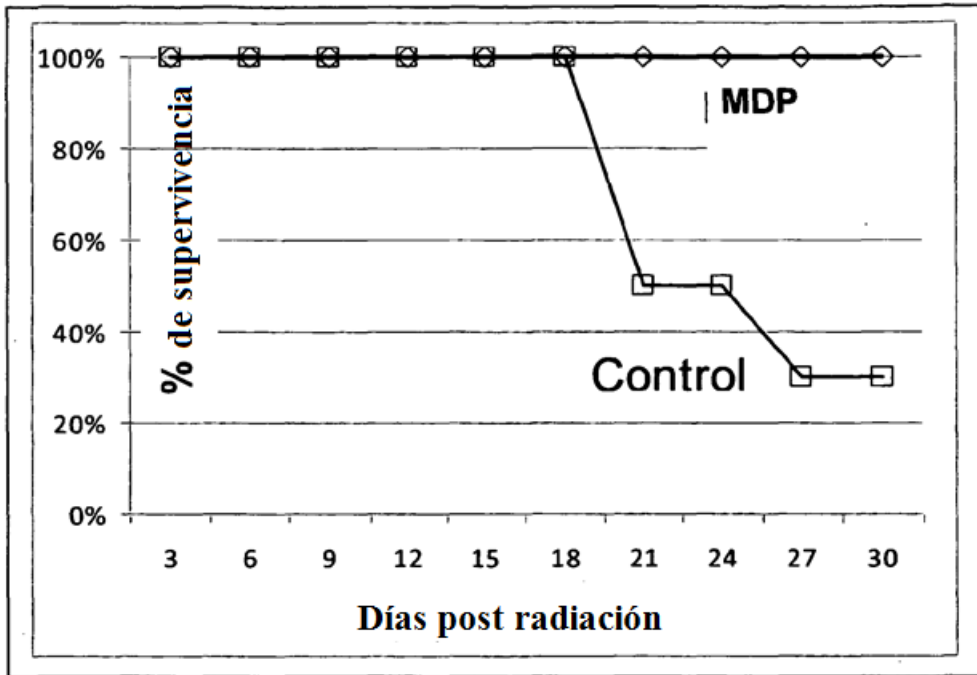


Figura 8

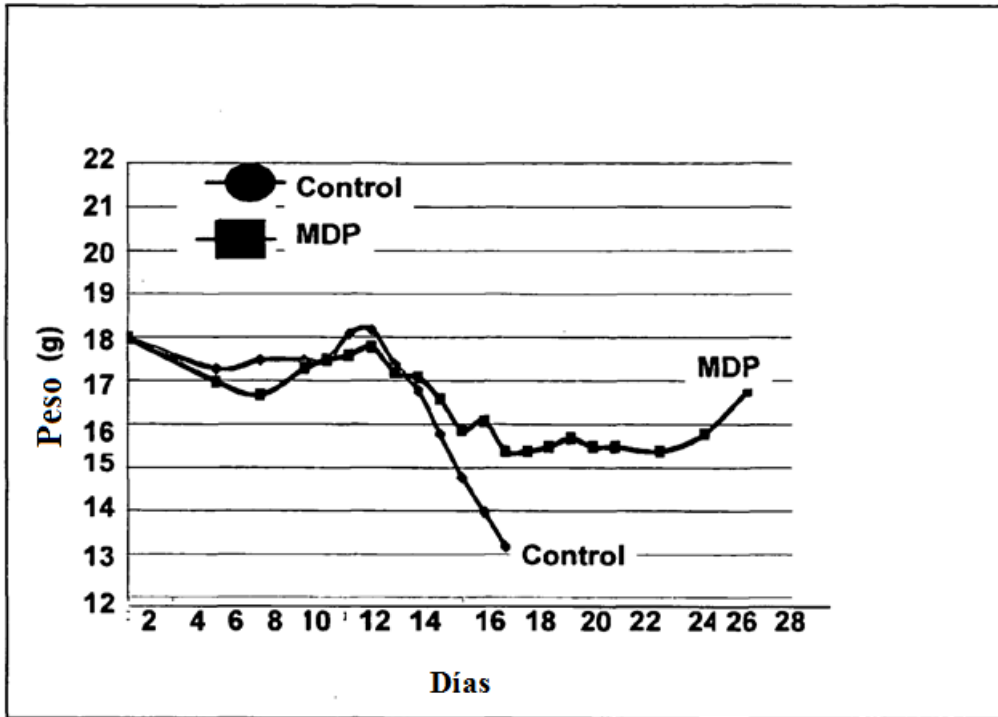


Figura 9

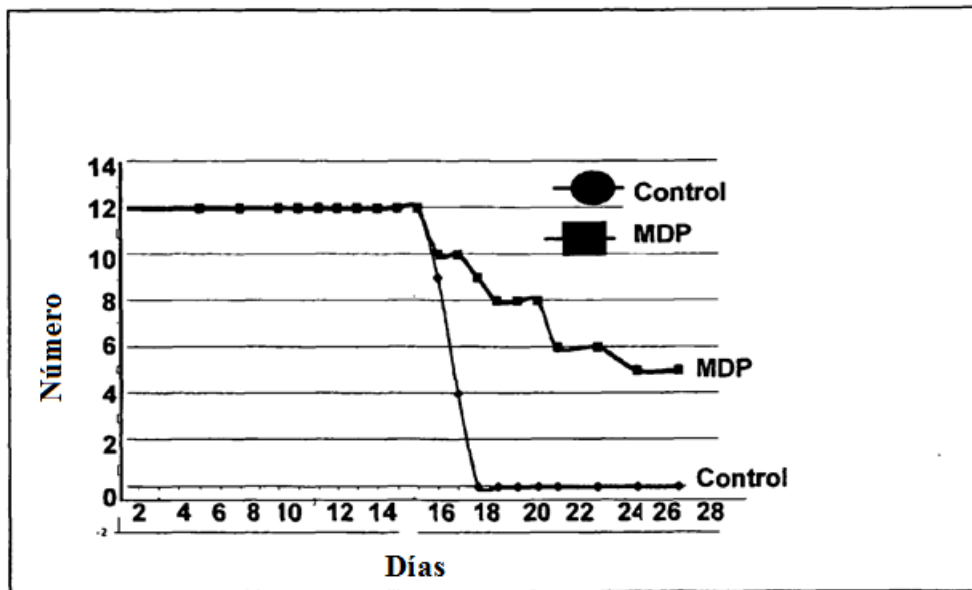


Figura 10



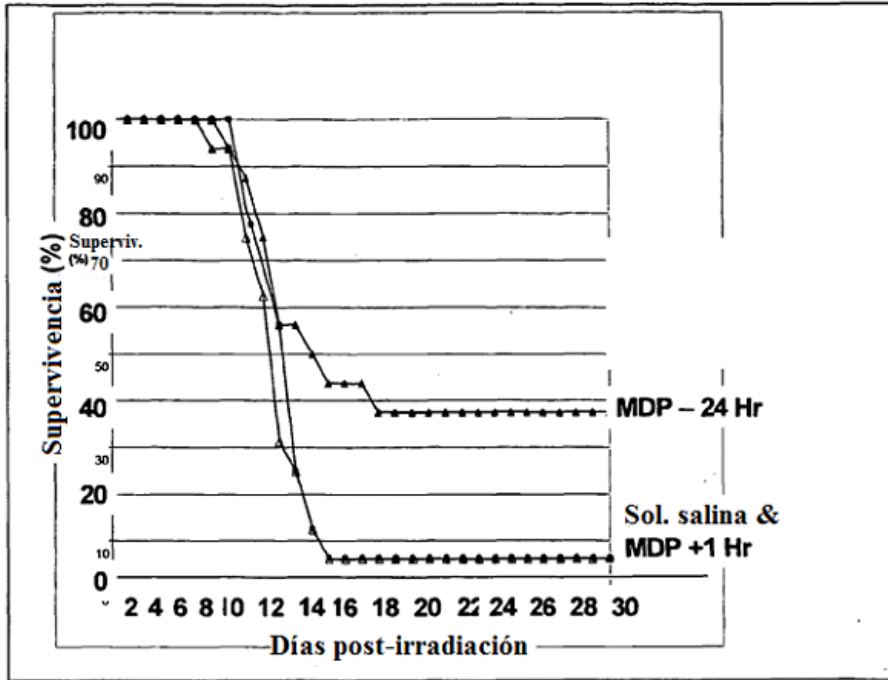


Figura 11

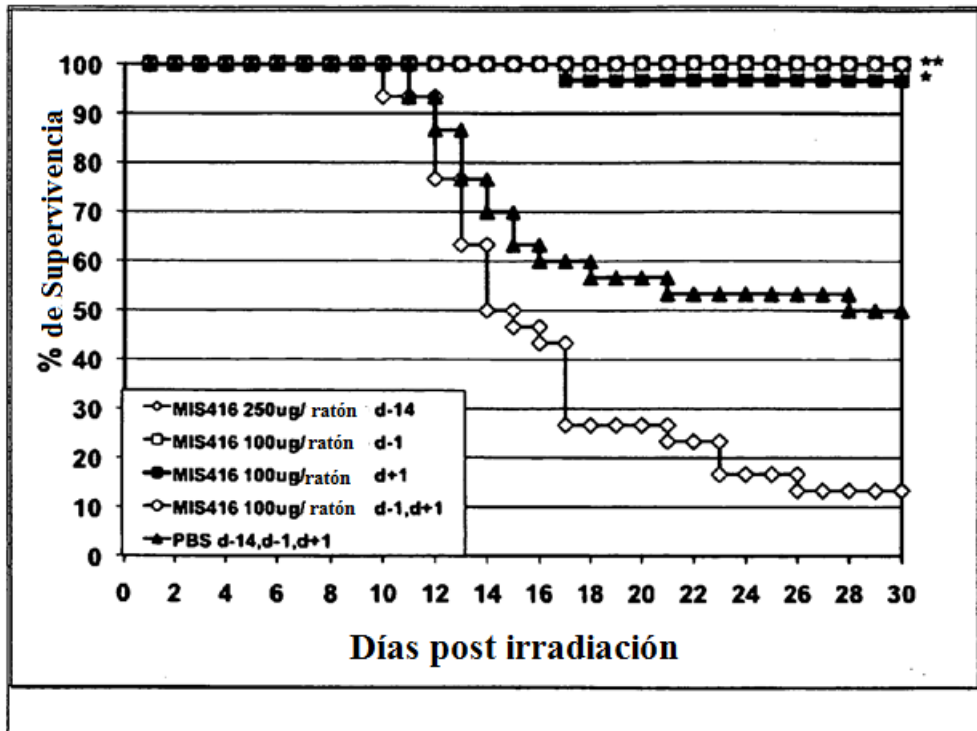


Figura 12

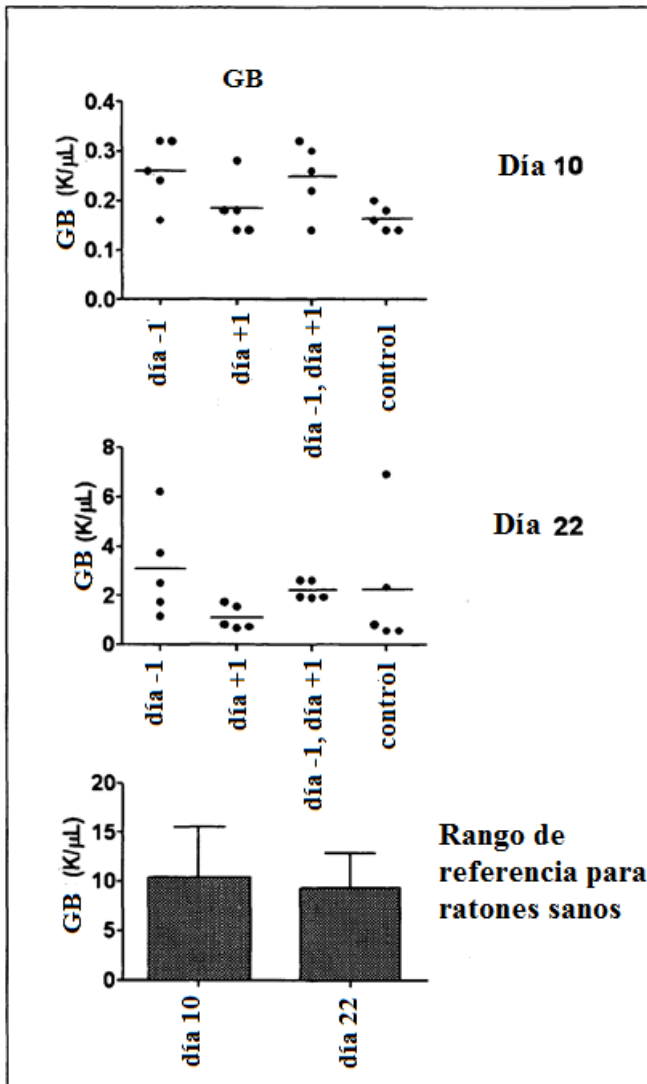


Figura 13



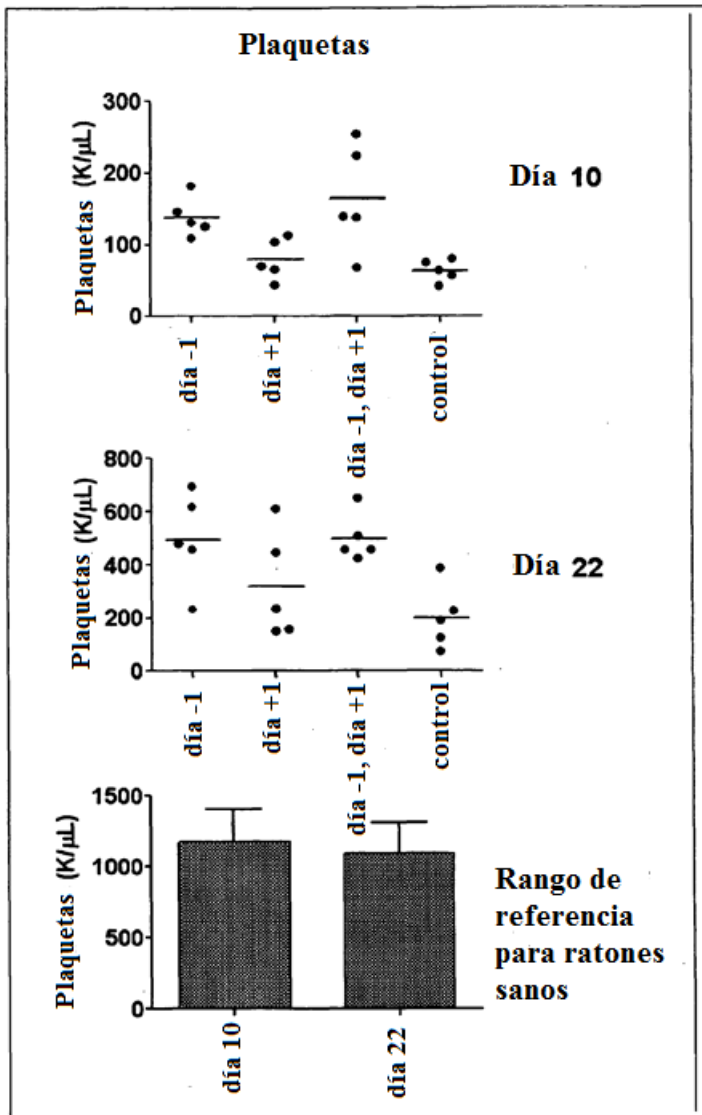


Figura 13 (cont.)

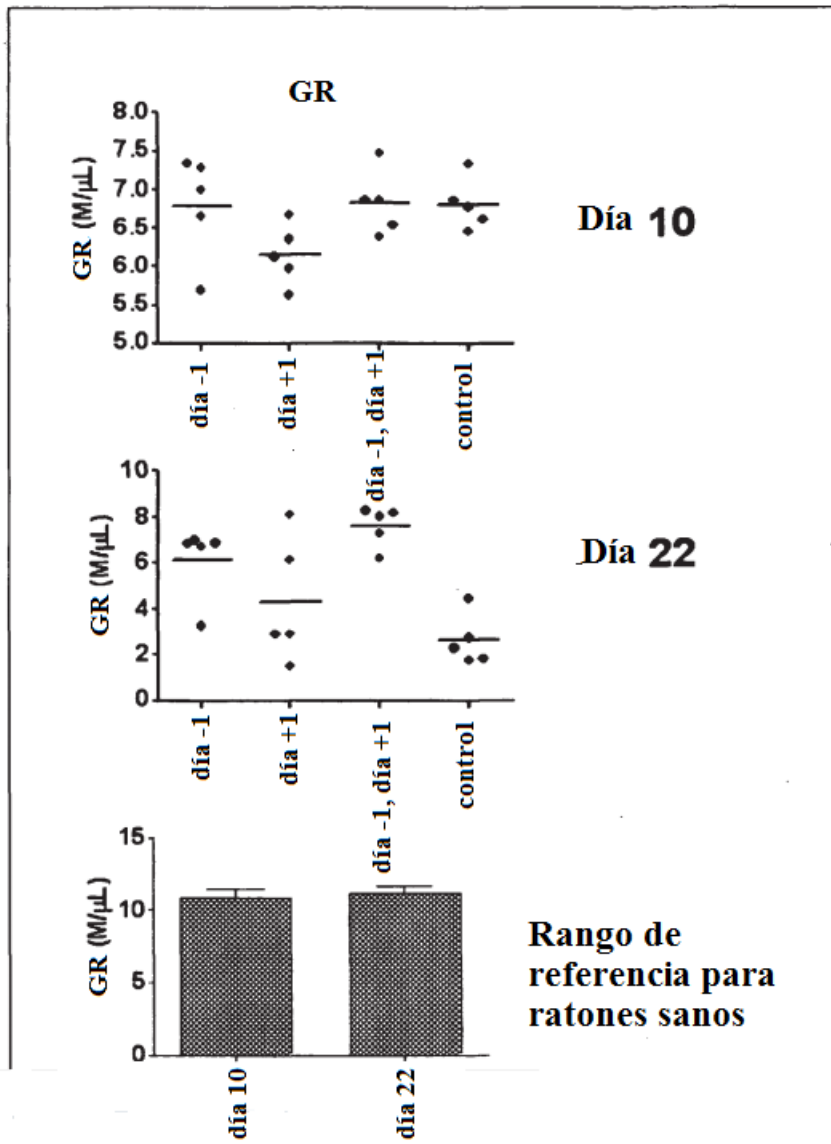


Figura 14