

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 565**

51 Int. Cl.:

C07K 5/062 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010 E 10789788 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2442832**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de la esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

16.06.2009 NZ 57773109

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

12.11.2014

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:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 521 565 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 esclerosis múltiple

5 **Campo técnico**

[0001] La presente invención concierne a nuevas composiciones inmunoestimulantes que comprenden micropartículas de dipéptido de muramilo para su uso en el tratamiento de la EM, y para su uso en el tratamiento de los síntomas de la esclerosis múltiple en un sujeto con esclerosis múltiple.

10

Antecedentes de la técnica

[0002] La esclerosis múltiple (abreviada EM), es una afección autoinmune en la que el sistema inmunitario ataca al sistema nervioso central, produciendo una desmielinización. La aparición de la enfermedad se produce habitualmente en adultos jóvenes, y es más común en mujeres. Tiene una prevalencia que varía entre 2 y 150 por 100.000.

[0003] La EM afecta a la capacidad de las células nerviosas del cerebro y de la médula espinal para comunicarse entre sí. Las células nerviosas se comunican mediante el envío de señales eléctricas denominadas potenciales de acción a lo largo de largas fibras denominadas axones, que están envueltas por una sustancia aislante denominada mielina. En la EM, el propio sistema inmunitario del cuerpo ataca y daña la mielina. Cuando se pierde la mielina, los axones ya no pueden conducir eficazmente las señales. El nombre de esclerosis múltiple se refiere a las cicatrices (esclerosis - más conocidas como placas o lesiones) en la sustancia blanca del cerebro y de la médula espinal, que está principalmente compuesta por mielina. Aunque se sabe mucho sobre los mecanismos implicados en el proceso patológico, la causa sigue siendo desconocida. Algunas teorías incluyen aspectos genéticos y/o infecciones. También se han encontrado diferentes factores de riesgo ambientales.

[0004] Con la enfermedad puede aparecer prácticamente cualquier síntoma neurológico, y a menudo progresa hacia una discapacidad física y cognitiva. La EM toma muchas formas, apareciendo nuevos síntomas bien con brotes discretos (formas recurrentes) o lentamente acumulándose con el tiempo (formas progresivas). Entre los brotes, los síntomas pueden desaparecer completamente, pero a menudo se producen problemas neurológicos permanentes, especialmente según avanza la enfermedad. La EM es identificada a veces casualmente durante exámenes neurológicos realizados por otras causas.

[0005] No hay una cura conocida para la EM. Los tratamientos intentan devolver la función después de un brote, evitar nuevos brotes y evitar la discapacidad. Las medicaciones de la EM pueden tener efectos adversos por ser mal toleradas, y muchos pacientes buscan tratamientos alternativos a pesar de la ausencia de estudios científicos que los respalden. El pronóstico es difícil de predecir; depende del subtipo de la enfermedad, de las características de la enfermedad del paciente individual, de los síntomas iniciales y del grado de discapacidad que experimente la persona según avanza el tiempo.

[0006] La esperanza de vida de las personas con EM, al menos para los años tempranos, es prácticamente la misma que la de las personas no afectadas. Prácticamente el 40 % de los pacientes alcanzan la septuagésima década de vida. No obstante, la mitad de las muertes en las personas con EM están relacionadas directamente con las consecuencias de la enfermedad, mientras que más del 15 % son debidas a suicidios, un porcentaje mucho mayor que en la población sana.

[0007] Aunque la mayoría de los pacientes pierden la capacidad de andar antes de su muerte, el 90 % todavía son capaces de andar solos a los 10 años de la aparición, y el 75 % a los 15 años.

50

[0008] La EM da como resultado una disminución o una pérdida completa de la mielina, y según avanza la enfermedad, el corte (sección transversal) de las extensiones de las neuronas o axones. Cuando se pierde la mielina, una neurona ya no puede conducir de forma eficaz las señales eléctricas. En las fases tempranas de la enfermedad tiene lugar un proceso de reparación denominado remielinación, pero los oligodendrocitos no pueden reconstruir completamente la vaina de mielina de las células. Los brotes repetidos conducen a unas remielinaciones sucesivamente menos eficaces, hasta que se crea una placa de tipo cicatrizal alrededor de los axones dañados.

[0009] Aparte de la desmielinización, que está causada por los linfocitos T, la otra característica patológica de la enfermedad es la inflamación. La implicación central de un amplio abanico de mediadores inflamatorios en la esclerosis múltiple progresiva está bien establecida. Estos factores juegan múltiples papeles, incluyendo facilitar la migración de los linfocitos T en el sistema nervioso central (SNC), romper la barrera hematoencefálica y promover la destrucción de la mielina y la degeneración de los axones en la fase temprana de la enfermedad. La fase tardía está asociada con unas lesiones predominantemente neuroaxonales como resultado de la exposición del axón desnudo en las placas desmielinizadas.

65

Tratamiento

[0010] Aunque no existe una cura conocida para la esclerosis múltiple, varias terapias han demostrado ser útiles. Las principales aspiraciones de la terapia son devolver la función después de un brote, prevenir nuevos brotes y
5 prevenir la discapacidad. Como con cualquier tratamiento médico, las medicaciones usadas en el tratamiento de la EM tienen varios efectos adversos. Los tratamientos alternativos son perseguidos por algunos pacientes, a pesar de la escasez de estudios científicos, comparables, replicados que los respalden.

[0011] Las estrategias de tratamiento actuales implican estrategias tanto inmunomoduladoras como
10 inmunosupresoras que aspiran a una reducción de la fase inflamatoria. Durante los brotes sintomáticos, la administración de unas dosis elevadas de corticosteroides intravenosos, tales como metilprednisolona, es la terapia rutinaria para las recaídas agudas. El objetivo de este tipo de tratamiento es terminar con el brote rápidamente y dejar las menores deficiencias duraderas en el paciente. Aunque generalmente son eficaces a corto plazo para aliviar los síntomas, los tratamientos con corticosteroides no parecen tener un impacto significativo sobre la
15 recuperación a largo plazo. Los potenciales efectos secundarios incluyen osteoporosis y un deterioro en la memoria, siendo este último reversible.

[0012] Los tratamientos modificadores de la enfermedad son caros y la mayoría de éstos requieren inyecciones
frecuentes (incluso diariamente). Otros requieren infusiones IV a unos intervalos de 1 - 3 meses. Los agentes no
20 específicos, tales como los interferones, tienen una eficacia limitada a largo plazo y no son bien tolerados.

[0013] Desde 2007 se han aprobado para la EM seis tratamientos modificadores de la enfermedad por parte de las
autoridades sanitarias de diferentes países. Tres son interferones: dos formulaciones de interferón beta-1a (nombres
registrados *Avonex*, *CinnoVex*, *ReciGen* y *Rebif*) y una de interferón beta-1b (nombre registrado en los Estados
25 Unidos *Betaseron*, en Europa y Japón *Betaferon*). Una cuarta medicación es el acetato de glatiramer (*Copaxone*). La quinta medicación, mitoxantrona, es un inmunosupresor usado también en la quimioterapia oncológica, aprobado únicamente en los Estados Unidos y ampliamente para una EM secundaria progresiva. El sexto es natalizumab (comercializado como *Tysabri*), un anticuerpo anti-VLA-4 que bloquea el tráfico de las células inmunitarias y reduce eficazmente la inflamación del SNC. Las seis medicaciones son modestamente eficaces para disminuir el número de
30 brotes y ralentizar la progresión hacia la incapacidad, aunque sus índices de eficacia difieren, y los estudios de sus efectos a largo plazo aún no están disponibles. Las comparaciones entre los inmunomoduladores (todos excepto la mitoxantrona) muestran que el más eficaz es el natalizumab, tanto en términos de índice de reducción de las recaídas como de detención de la progresión hacia la discapacidad; también se ha demostrado que reduce la gravedad de la EM. La mitoxantrona puede ser el más eficaz de todos; sin embargo, generalmente no se considera
35 una terapia a largo plazo, ya que su uso está limitado por su grave cardiotoxicidad.

[0014] Los interferones y el acetato de glatiramer se administran mediante inyecciones frecuentes que varían
desde una vez al día para el acetato de glatiramer hasta una vez a la semana (pero intramuscular) para el *Avonex*.
El natalizumab y la mitoxantrona se administran mediante una infusión IV a intervalos mensuales. El tratamiento de
40 la EM progresiva es más difícil que el de la EM recurrente-remitente. La mitoxantrona ha demostrado unos efectos positivos en pacientes con unos cursos progresivos secundarios y progresivos recurrentes. Es moderadamente eficaz en la reducción de la progresión de la enfermedad y de la frecuencia de las recaídas en los pacientes en un seguimiento a corto plazo. No se ha demostrado que ningún tratamiento modifique el curso de la EM primaria progresiva.

[0015] Hay varios tratamientos en investigación que pueden limitar los brotes o mejorar la función. Algunos de
estos tratamientos implican la combinación de fármacos que ya están en uso para la esclerosis múltiple, tales como
la administración conjunta de mitoxantrona y de acetato de glatiramer (*Copaxone*). Sin embargo, la mayoría de los
tratamientos que ya están en ensayos clínicos implican fármacos que se usan en otras enfermedades. Más
50 recientemente se han implicado fuertemente unos auto-anticuerpos reactivos con la neurofascina 186, una importante proteína de las fibras nerviosas, en la degeneración neuronal asociada a la EM progresiva, y representan un potencial nuevo objetivo.

[0016] Como con cualquier tratamiento médico, estos tratamientos tienen varios efectos adversos. Uno de los más
habituales es la irritación en el sitio de la inyección para los tratamientos con acetato de glatiramer y con interferón.
Con el tiempo puede aparecer una marca visible en el sitio de inyección debido a la destrucción local del tejido
adiposo, conocida como lipoatrofia. Los interferones producen unos síntomas similares a los de la gripe; algunos
pacientes que toman glatiramer experimentan una reacción posterior a la inyección que se manifiesta por
rubefacción, opresión en el pecho, palpitaciones cardíacas, disnea y ansiedad, que habitualmente duran menos de
60 treinta minutos. Son más peligrosos los daños hepáticos de los interferones y la mitoxantrona, los efectos inmunosupresores y la toxicidad cardíaca de los últimos; y la supuesta relación entre el natalizumab y algunos casos de complicaciones potencialmente mortales tales como una leucoencefalopatía multifocal progresiva.

[0017] Por lo tanto, todavía hay una necesidad de tratamientos alternativos para la EM que tengan unos perfiles
terapéuticos y unos efectos secundarios mejorados.

[0018] Es un objeto de la presente invención superar o mejorar al menos uno de los inconvenientes de las terapias de la técnica anterior o proporcionar una alternativa útil.

Sumario de la invención

5

[0019] La presente invención está definida por las reivindicaciones.

[0020] De acuerdo con un primer aspecto que también se describe en este documento, se proporciona un método para el tratamiento de la esclerosis múltiple que comprende la administración a un sujeto que requiere dicho tratamiento de una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula.

[0021] De acuerdo con un segundo aspecto, también se describe en este documento un método para el tratamiento de los síntomas de la esclerosis múltiple que comprende la administración a un sujeto que requiere dicho tratamiento de una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula.

15

[0022] De acuerdo con un tercer aspecto, también se describe en este documento un método de terapia conjunta en el tratamiento de la esclerosis múltiple que comprende la administración a un sujeto que requiere dicho tratamiento de una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula y de otro agente activo eficaz en el tratamiento de esclerosis múltiple.

20

[0023] Preferiblemente, el tipo de esclerosis múltiple que se va a tratar es la esclerosis múltiple progresiva. La esclerosis múltiple progresiva puede ser esclerosis múltiple progresiva primaria, progresiva secundaria o progresiva crónica. Alternativamente, el tipo de esclerosis múltiple que se va a tratar es la esclerosis múltiple recurrente-remite.

25

[0024] Las composiciones que comprenden dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula (MIS416) puede ser administradas a un sujeto mediante cualquier medio conocido, pero preferiblemente se administran mediante infusión o inyección. Algunos modos adecuados de administración también pueden elegirse de entre intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, subcutáneo, rectal, nasal, oral, intragástrico, pulmonar y similares.

30

[0025] La dosis de la MIS416 puede ser fácilmente determinada por un médico teniendo en consideración el tipo de esclerosis múltiple, la gravedad de la enfermedad y sus síntomas, y el estado global del paciente. Típicamente, la dosis se administrará en el intervalo de 50 µg a 1.500 µg y puede administrarse diariamente, semanalmente, quincenalmente o mensualmente. Un ejemplo de un régimen de dosificación adecuado podría comenzar con una dosis inicial de 100 µg de MIS416 seguida de unas dosis aumentadas en, por ejemplo, 50 µg - 200 µg por semana o quincenalmente, hasta que se observen en el paciente los efectos terapéuticos beneficiosos apropiados, sin unos efectos secundarios significativos. La dosis puede administrarse como una dosis única en bolo o infundida con el tiempo, o administrarse en dosis divididas.

[0026] Cuando se administran como una terapia conjunta, las composiciones de la MIS416 pueden administrarse con otros agentes activos usados en el tratamiento de la EM, por ejemplo esteroides, interferones, anticuerpos, y similares.

[0027] Otros agentes activos usados en el tratamiento de la EM, que podrían usarse junto con las composiciones de MIS416 pueden elegirse de entre corticosteroides, tales como la metilprednisolona, interferones, tales como el interferón beta-1a y el interferón beta-1b, acetato de glatiramer, mitoxantrona, anticuerpos, tales como natalizumab, o combinaciones de los mismos.

[0028] Las composiciones de la MIS416 pueden administrarse simultáneamente con otros agentes eficaces en el tratamiento de la EM, o pueden administrarse secuencialmente.

[0029] La presente invención proporciona una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

[0030] La presente invención proporciona adicionalmente una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula para su uso en el tratamiento de los síntomas de la esclerosis múltiple en un sujeto con esclerosis múltiple.

[0031] La presente invención también proporciona una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula para su uso en una terapia conjunta para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.

[0032] En el contexto de la presente divulgación, las composiciones que comprenden dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula (la micropartícula de MDP) se denominarán de forma intercambiable en este documento MIS o MIS416.

65

Breve descripción de las figuras

[0033]

- 5 Figura 1: la MIS416 induce citocinas antiinflamatorias.
- Figura 2: inhibición de las citocinas séricas Th2 en pacientes de EM después de un único bolo i.v. de MIS416.
- 10 Figura 3: las terapias con MIS416 de un paciente con una EM progresiva durante hasta 12 semanas da lugar a una reducción en los niveles séricos de la moléculas de adhesión celular importantes para la migración de los leucocitos.
- Figura 4: la MIS416 induce la producción del IFN α por parte de las células dendríticas plasmocitoides, las células inmunitarias más potentes secretoras del IFN α . El IFN α tiene utilidad clínica en algunas formas de esclerosis múltiple.
- 15 Figura 5: la MIS416 inhibe la proliferación de los linfocitos T en respuesta a un antígeno no propio del MHC (aloantígeno). Los agentes que pueden inhibir la proliferación de los linfocitos T tienen un potencial para reducir la activación autorreactiva de los linfocitos T asociada con la esclerosis múltiple.
- 20 Figura 6: la MIS416 induce mecanismos que retrasan la aparición y la incidencia de la esclerosis múltiple recurrente-remitente en un modelo de ratón cuando se administra en el momento de la inducción de la enfermedad.
- 25 Figura 7: un pretratamiento con MIS416 induce los mecanismos que mejoran la fase de recuperación espontánea de la enfermedad en un modelo de ratón de esclerosis múltiple recurrente-remitente.
- 30 Figura 8: la terapia a largo plazo con MIS416 en pacientes con EM progresiva da lugar a una reducción sostenida en los elevados niveles de las moléculas de adhesión solubles importantes en el tráfico de leucocitos.
- Figura 9: estudio repetitivo (experimento #2) que demuestra que la MIS416, administrada en el momento de la inducción de una encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en el modelo de ratón de esclerosis múltiple, retrasa la frecuencia de aparición y la gravedad de la enfermedad.
- 35 Figura 10: en el experimento #2, el tratamiento con la MIS416 en el momento de la inducción de la enfermedad en el modelo de ratón de EAE también reduce significativamente la puntuación máxima de la enfermedad.
- 40 Figura 11: el tratamiento con la MIS416 en el momento de la inducción de la enfermedad en el modelo de ratón de EAE aumenta significativamente los niveles de IFN- γ presentes en el suero sanguíneo periférico.
- 45 Figura 12: el tratamiento con la MIS416 en el momento de la inducción de la enfermedad en el modelo de ratón de EAE aumenta significativamente las cifras absolutas de monocitos en sangre periférica en el día 22 posterior a la inducción de la EAE.

Descripción de la forma de realización preferida

[0034] Ahora se ha averiguado inesperadamente que el dipéptido de muramilo en forma de una micropartícula que comprende fragmentos de ADN, que pueden modular varios aspectos del sistema inmunitario de forma simultánea, puede representar un tratamiento más eficaz para la EM, tanto para el tipo progresivo como para el recurrente-remitente. Sin desear ceñirnos a ninguna teoría, la micropartícula de la presente invención también parece contener fragmentos de ADN que pueden modular varios aspectos del sistema inmunitario de forma simultánea. Según se ha demostrado en este documento mediante el estudio del caso de una paciente con una EM progresiva y en modelos animales de EM recurrente-remitente, el tratamiento multidosis con una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula (micropartícula de MDP o MIS416), es eficaz como una terapia individual sin provocar unos efectos secundarios significativos.

- La MIS416 es un modificador de la respuesta inmunitaria multimodal que activa un amplio abanico de rutas inmunorreguladoras implicadas en la gestión de la EM. Estas incluyen la inducción de los mediadores antiinflamatorios naturales tales como la IL-10 y la PGE2, que también sirven para inhibir las respuestas desreguladas de los linfocitos T y B.
- El tratamiento con la MIS416 de una paciente con una EM progresiva muestra una reducción en los niveles séricos de las moléculas de adhesión importantes en el tráfico de leucocitos. En particular, la MIS416 es eficaz en la reducción de la sVCAM-1, que interactúa con la integrina de leucocitos VLA-4. Esto sugiere que la terapia

con la MIS416 regula por disminución la regulación por aumento asociada a la EM de estas moléculas. El beneficio terapéutico de la modulación de esta ruta de tráfico dependiente de la VLA-4 ha sido validado por el natalizumab, sin embargo, la MIS416 no es tóxica. La terapia con la MIS416 también muestra una modulación de los elevados niveles de ICAM-1 y de E-selectina.

- La MIS416 puede alterar la incidencia y la gravedad de la enfermedad en el modelo de ratón de esclerosis múltiple recurrente-remitente (EAE). En estos estudios se han identificado algunos potenciales mecanismos de acción de la MIS416. De particular interés es la inducción mediada por la MIS416 de los elevados niveles de IFN- γ que es protectora de la EAE en este modelo de ratón. La terapia con la MIS416 también aumenta el recuento absoluto de monocitos circulantes, lo que indica que han sido efectivamente movilizados. Los monocitos son una fuente celular de IL-10, una conocida citocina antiinflamatoria.

- Al contrario que otros agentes aprobados para el tratamiento de la EM, la MIS416 no es tóxica ni inmunógena, y es adecuada para el tratamiento a largo plazo.

[0035] Las composiciones que contienen MIS416 pueden ser administradas mediante cualquier medio adecuado. Algunos métodos de administración ejemplares son inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, gota ocular, a través del agua de bebida, en aerosol o en aerosol nasal. Cuando se administra en animales, puede usarse cualquier formulación veterinaria adecuada. Además de las descritas anteriormente, las formulaciones pueden estar en forma de polvos o de pastas, y pueden añadirse a la comida o administrarse por vía oral de la forma habitual. Los protocolos de formulación y los excipientes adecuados pueden encontrarse en los textos habituales, tales como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Ed., 1995 (Mack Publishing Co. Pennsylvania, EE.UU.), la Farmacopea Británica, 2000, y similares.

[0036] La dosis individual apropiada de la composición de la micropartícula de MDP, la cantidad total administrada y la duración de la administración pueden ser fácilmente determinadas por el médico basándose en las orientaciones proporcionadas en este documento, en la naturaleza y la gravedad de la EM y sus síntomas, y en la respuesta del paciente al tratamiento. Como un ejemplo, las dosis individuales útiles pueden elegirse del intervalo de 50 μg a 1.000 μg , y pueden administrarse diariamente, semanalmente o mensualmente dependiendo del estado del paciente, de los síntomas, de la tolerancia y de la respuesta al tratamiento. La composición de micropartícula de MDP puede administrarse a unas dosis elegidas de desde aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975 ó 1.000 μg . También pueden usarse unas dosis en un intervalo mayor dependiendo de las necesidades, por ejemplos, unas dosis en el intervalo de 50 μg a 1.500 μg . La cantidad total de la micropartícula de MDP administrada dependerá de la respuesta del paciente y de la tolerancia al tratamiento. La composición puede administrarse diariamente, semanalmente, quincenalmente o mensualmente durante un periodo total que depende de la respuesta del paciente.

[0037] Sin querer estar ceñidos a ningún mecanismo de acción en particular, se cree que la acción de la MIS416 implica al menos en parte una fase inflamatoria transitoria, una fiebre de grado 1 - 3 y escalofríos en asociación con una dosis terapéutica. Por lo tanto, podría esperarse que una dosis inicial de 50 μg a 100 μg de MIS416 desencadenará poca o ninguna respuesta, y por lo tanto puede constituir una primera dosis apropiada en un régimen de tratamiento de aumento de la dosis en el que el objetivo es desencadenar finalmente una respuesta de fiebre baja y escalofríos. En ausencia de dicha respuesta, la dosis podría aumentarse en, por ejemplo, en 50 μg por semana o quincena hasta que el paciente notifique la respuesta leve deseada (de grado 1 a 2) de fiebre y escalofríos. El intervalo de dosificación puede variar dependiendo de la respuesta del paciente y de la tolerancia al tratamiento, y puede implicar una dosificación más frecuente con cantidades menores de la composición de micropartículas de MDP (por ejemplo, la dosis semanal o quincenal puede dividirse en dosis menores administradas diariamente, dos veces por semana o cualquier otro intervalo adecuado). Esto puede ser fácilmente determinado por los médicos basándose en la respuesta del paciente.

[0038] Para los expertos en la técnica estará claro que el tratamiento con MIS416 puede formar un componente de una terapia conjunta en el tratamiento de la EM. Por lo tanto, la MIS416 puede administrarse junto con otras terapias conocidas para la EM tales como interferones, esteroides, anticuerpos y similares. En el tratamiento de terapia conjunta, la MIS416 puede administrarse simultáneamente o secuencialmente con otros tratamientos.

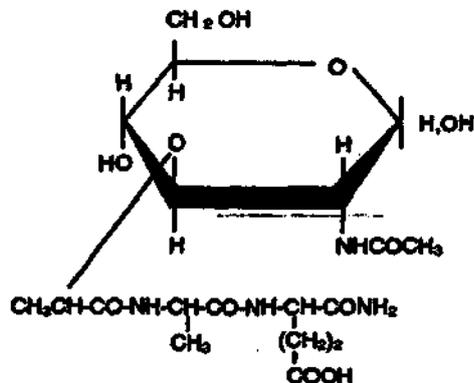
[0039] La invención se describirá ahora más particularmente con referencia a ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de la micropartícula de MDP

[0040] Una repetición múltiple del dipéptido de muramilo (MDP) aislado a partir de *Propionibacterium acini*, formaba la estructura del núcleo de la micropartícula inmunoestimulante de MDP de este ejemplo. La composición

química de la subunidad monomérica preferida es como se muestra a continuación.



[0041] El MDP tiene unas propiedades inmunoestimulantes bien conocidas, que han sido ampliamente evaluadas en estudios diseñados para determinar su efecto sobre el aumento de la función inmunitaria. Hasta la fecha, tanto el MDP aislado a partir de fuentes naturales como el MDP sintético se han asociado con una toxicidad significativa cuando se administraban a mamíferos. Esta toxicidad ha limitado la eficacia del MDP como coadyuvante.

[0042] Un método para el aislamiento del MDP, exento de componentes tóxicos, se describe en la solicitud internacional pendiente de tramitación PCT/NZ2009/000049. En resumen, se hizo crecer *Propionibacterium acnes* hasta una fase de crecimiento semiestacionaria y se lavó para eliminar los contaminantes con origen en el cultivo bacteriano empleando las técnicas bien conocidas por los de la técnica. Los componentes hidrófobos contenidos en las paredes celulares y el citoplasma fueron extraídos secuencialmente mediante lavados sucesivos con concentraciones crecientes de etanol / isopropanol / agua (10 %:10 %:80 %, 25 %:25 %:50 % y 40 %:40 %:20 %) a unas temperaturas elevadas. Después se elimina el alcohol isopropílico con unos lavados sucesivos con concentraciones decrecientes (80 %, 50 %, 40 % y 20 %) de etanol a unas temperaturas elevadas. Entonces la micropartícula de MDP resultante se suspende en guanidina-HCl 6 M y después se lava con agua para irrigación y se mide su concentración relacionando su absorbancia a 540 nm con la absorbancia de los patrones de turbidez.

[0043] El análisis de esta preparación demostró que el dipéptido de muramilo se había reticulado ampliamente y tenía un tamaño de micropartícula predominantemente en el intervalo de 1 a 3 micrómetros. Las micropartículas de MDP contienen ácido murámico con un dipéptido de L-alanina-D-isoglutamina unido por amino y fragmentos de ADN bacterianos. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría en particular, se cree que es probable que el (los) fragmento(s) de ADN sea(n) un(os) componente(s) bioactivo(s) de la micropartícula. Dicha micropartícula puede aislarse a partir de fuentes naturales, como anteriormente, o sintetizarse mediante el uso de procedimientos sintéticos bien conocidos (por ejemplo, Liu G.; Zhang S.-D.; Xia S.-Q.; Ding Z.-K. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10 (12), 2000, páginas 1361 - 1363 (3); Schwartzman S. M., Ribi E., *Prep Biochem.* 1980; 10 (3): 255 - 67; Ohya y col. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 1993; 8: 351 - 364). Las micropartículas de MDP generadas mediante los presentes métodos pueden tener un amplio intervalo de tamaños (por ejemplo, de 0,01 - 30 micrómetros) pero el intervalo de tamaños más común es de 1 a 7 micrómetros. El tamaño preferido está en el intervalo de 0,5 - 3 micrómetros.

[0044] La concentración de la micropartícula de MDP se ajustó a 10 mg/ml en cloruro de sodio para su administración i.v y se dispensó en viales de dosis única que contenían 1,5 ml. En este documento, esta formulación de la micropartícula de MDP en cloruro de sodio se denomina MIS o MIS416. Cuando un paciente está recibiendo la MIS416, es preferible prediluir la MIS416 hasta una concentración más conveniente para su administración cuando se administran unas dosis menores de 1.000 µg (1 mg). Esto puede llevarse a cabo retirando el volumen apropiado de MIS416 del vial de fármaco mediante el uso de una jeringa de insulina e inyectando la dosis en una segunda jeringa que contiene 1 - 2 ml de disolución salina normal para inyección.

Ejemplo 2 - La estimulación con MIS416 de PBMC humanos da como resultado la producción de las citocinas antiinflamatorias IL-10 y PGE2

[0045]

(A) se cultivaron PBMC humanos (10^6 /ml) con LPS (*E. coli*; 100 ng/ml) que sirvieron como un control positivo de ensayo, o MIS416 a 50, 20 y 5 µg/ml durante un periodo de cultivo total de 55 horas. Los sobrenadante exentos de células se recogieron a las 22 horas y a las 55 horas y se ensayaron para comprobar la IL-10 secretada mediante el uso de una tecnología de citometría de flujo en matriz de microesferas de acuerdo con los protocolos estándar del fabricante (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria). (B) Se cultivaron PBMC humanos (10^6 /ml) durante un total de 96 horas con MIS a 10, 1 y 0,1 µg/ml. La coestimulación con PMA (1 nM) + Ionomicina (100 ng/ml) sirvió como un control positivo del ensayo. Los sobrenadantes exentos de células se recogieron a las 24,

48 y 72 horas y se ensayaron para comprobar la PGE2 mediante el uso de un ELISA de PGE2 comercial usado exactamente de acuerdo con la recomendación de los fabricantes (R&D Systems Inc. Minneapolis, EE.UU.). Los resultados se proporcionan en la Figura 1.

5 Ejemplo 3 - La terapia con MIS416 reduce los niveles séricos de las citocinas que se sabe que están implicadas en la inmunidad humoral y en la producción de auto-anticuerpos

10 **[0046]** Se recogió suero sanguíneo periférico de un paciente que recibió una única dosis de MIS416 de uso compasivo inmediatamente antes de, y a las 24 y a las 48 horas después de, un único bolo i.v. de MIS416 diluido en disolución salina. Se determinaron la IL-4 y la IL-5 en el suero mediante el uso de citometría de una tecnología de citometría de flujo en matriz de microesferas de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria). Los resultados se proporcionan en la Figura 2.

15 Ejemplo 4 - La terapia con MIS416 reduce los niveles séricos de las moléculas de adhesión celular centrales para el tráfico de leucocitos

20 **[0047]** Se recogió sangre periférica anticoagulada con heparina de un paciente con esclerosis múltiple progresiva YV inmediatamente antes de la dosificación con MIS416 en las semanas 1, 2, 3, 4 y 12 de la terapia con MIS. Se recogió el suero a partir de la sangre y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Las muestras séricas fueron analizadas para comprobar las moléculas de adhesión solubles sE-selectina, sICAM-1 y sVCAM-1 simultáneamente mediante el uso de una tecnología de citometría de flujo en matriz de microesferas (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria). Los resultados se proporcionan en la Figura 3.

25 Ejemplo 5 - La terapia con MIS416 para el tratamiento de la esclerosis múltiple progresiva da como resultado una inhibición de la progresión de la enfermedad y una mejora en los síntomas existentes de la enfermedad y en la calidad de vida

30 **[0048]** En Nueva Zelanda, según la Ley del Medicamento, un paciente puede recibir una medicina no autorizada sobre una base de un uso compasivo. En el ejemplo de la paciente con esclerosis múltiple progresiva descrito a continuación, se administró la MIS416 como una terapia individual mediante un único bolo i.v. "inyectado" diluido en disolución salina. El programa de dosis recibidas se detalla en la Tabla 1. Todas las dosis de la MIS416 se diluyeron hasta un volumen final de 2 ml en disolución salina.

35 **Tabla 1 Régimen de dosificación para el tratamiento de la paciente YV**

Paciente YV		
Dosis	Cronología de la dosis	Tamaño de la dosis (µg)
1	Día 1	1500
2	Día 9	150
3	Día 16	250
4	Día 23	250
5	Día 30	350
6	Día 37	500
7	Día 44	500
8	Día 49	500
9	Día 58	500
10	Día 64	550
11	Día 71	550
12	Día 79	650
13	Día 86	750
14	Día 93	750
15	Día 100	750

16	Día 107	750
17	Día 114	800
18	Día 121	800
19	Día 137	500
20	Día 151	500
21	Día 165	500
22	Día 186	250
23	Día 200	350
24	Día 214	400

[0049] Se realizó un escáner por MRI después de 6 dosis, para proporcionar una base para la determinación de cualquier cambio posterior en la velocidad y la naturaleza de la progresión o cualquier otra mejora que pueda ser documentada mediante técnicas de imagen por MRI. El escáner de inicial de MRI mostró las típicas lesiones en cerebro y médula espinal de una EM progresiva de larga duración. La paciente no tenía ninguna sensibilidad ni era capaz de mover las piernas ni los pies desde hacía más de un año. Se tomaron muestras sanguíneas regulares para monitorizar los CPC de la paciente (recuento sanguíneo de la serie blanca, enzimas, etc.).

Notas sobre la progresión del tratamiento

10

[0050]

(i) Después de la elevada dosis inicial (1.500 µg) de la composición de MIS416, la paciente experimentó algunos efectos secundarios que necesitaron una reevaluación del régimen de dosificación para la futura dosificación semanal con la MIS416 en disolución salina. Se administraría un analgésico en el momento de proporcionar la dosis de la MIS416, si era necesario.

15

Como con cualquier otro efecto del tratamiento con la elevada dosis inicial, en un seguimiento de una semana después de la administración de las dosis iniciales de la composición de MIS416, se le pidió a la paciente que moviera los dedos de los pies y descubrió que era de hecho capaz de conseguirlo - por primera vez en un año.

20

(ii) La segunda dosis se administró a 100 µg de la composición de MIS416. La paciente realizó un diario detallado durante el transcurso del tratamiento.

(iii) Después de la tercera dosis de 250 µg de la composición de MIS416 no había unos efectos secundarios apreciables. La paciente tenía más sensibilidad en la punta del pie y podía sentir los huesos de los pies y mucha más fuerza en su espalda y estómago (su torso). Había vuelto a aparecer un antiguo síntoma - la paciente experimentaba ahora mucho dolor en los talones por la noche en la cama.

25

(iv) Después de su cuarta dosis de la composición de MIS416 (350 µg), la paciente tuvo el mismo día un intenso dolor de cabeza, pero al día siguiente estaba muy bien y podía sentir sus rodillas. Además, ahora era capaz de levantar los brazos por encima de su cabeza. La paciente consideró esto una etapa de gran avance.

30

La paciente también refirió que sus manos, que previamente estaban de color morado y frías, ahora estaban calientes y de color rosado. También perdió el constante rubor en su cara.

(vii) Un pariente de las afueras de la ciudad que no había visto a la paciente durante aproximadamente seis meses la visitó poco después de la séptima dosis del tratamiento con la MIS614, y quedó profundamente impresionado con su mejoría física y mental. En ese momento la paciente consiguió mantenerse de pie ¡por primera vez después de casi un año! La paciente dice que los dedos de los pies le pican constantemente y que puede sentir los huesos de la parte superior de los pies de nuevo.

35

La circulación en las manos y los pies de la paciente era mucho mejor y estaban ahora constantemente rosas y cálidos en lugar de morados y fríos. La paciente ya no vuelve a tener frío constantemente.

40

Recobró la sensibilidad en la espalda y ahora podía sentir el respaldo de la silla de ruedas contra su espalda. La paciente tiene todavía el apetito bajo y había desaparecido cualquier anterior ansia por la comida.

(viii) Después de la octava dosis de MIS416 la paciente estaba muy emocionada por comunicar que había conseguido sentarse (desde una posición horizontal en la cama) por sí misma, para su sorpresa y la de su fisioterapeuta.

45

La paciente continúa poniéndose de pie todos los días (apoyándose únicamente en una muleta) y nota que se mantiene mucho más recta. Todavía no puede andar pero se siente más fuerte estando de pie. La sensación de

quemazón en sus talones todavía está ahí - particularmente en un pie.

La paciente también ha desarrollado dolor en la espalda (porque ahora puede sentir de hecho su espalda, lo que no podía antes). Ahora puede estirar las piernas en la cama, lo que no era posible anteriormente, pero todavía es incapaz de rodar en la cama aunque frecuentemente intenta hacerlo.

5

(ix) No se notificaron cambios adicionales importantes después de la administración de desde la novena hasta la decimoctava dosis de MIS416, excepto porque había mejorado el patrón de sueño y había vuelto el apetito pero sin ningún ansia en particular por la comida. La paciente continúa sintiendo un aumento en la sensibilidad de los pies y nota que está comenzando a sentirse bien todo el tiempo, particularmente el día después de la administración de una dosis del tratamiento. La fuerza de la parte superior del cuerpo continúa mejorando.

10

(x) Después de la administración de la decimonovena dosis de MIS416 el régimen de tratamiento se modificó desde una administración semanal hasta una quincenal, para ayudar a una reducción adicional de los efectos secundarios tales como los dolores de cabeza y los temblores en las piernas. Después de la administración de la vigésima y la vigésimo primera dosis, la paciente continúa sintiéndose bien y el régimen alterado parece haber aliviado los dolores de cabeza. Duerme bien y todavía puede sentir el arnés que usa para dormir (ha conservado la sensibilidad en la espalda). Todavía es capaz de mantenerse erguida cuando la están acostando.

15

(xi) Después de las tres últimas dosis de MIS416 la paciente apreció una mejora adicional en sus pies: es capaz de sentir las sensaciones apropiadas en sus pies tales como calor y frío. Previamente sentía entumecimiento y nada, después, según volvía a sentir, un cosquilleo, seguido de quemazón en los talones, y ahora tiene una sensibilidad completa en los pies que responde a las condiciones locales.

20

[0051] La paciente siente que se mantiene de pie con un poco más de fuerza y se siente mejor de pie que antes.

25 Continúa sintiendo un fortalecimiento de la parte superior del cuerpo. Ahora se puede secar el pelo porque tiene la fuerza suficiente para levantar los brazos. Puede fregar los platos "sin caerse en el fregadero". Todavía tiene una cierta debilidad en la parte superior del cuerpo, pero ha mejorado mucho.

[0052] La paciente refiere que la dificultad que tenía para enfocar con uno de los ojos antes del tratamiento con la

30 MIS parece haberse resuelto desde la primera dosis de MIS, y el ojo enfoca ahora con normalidad.

[0053] La paciente se siente muy positiva y está segura de que está mejorando lentamente.

Tabla 2: resumen de las mejoras después del tratamiento con MIS416

35

Antes del tratamiento con MIS416	Después del tratamiento con MIS416
Incapaz de soportar peso en las piernas	Capaz de estar de pie (ayudada) durante hasta un minuto, y hacerlo varias veces al día, cada día. Tres semanas después de finalizar el tratamiento, se levantó tres veces al día durante dos minutos cada una. El marido aprecia que la paciente es mucho más fácil de levantar ya que parece tener más fuerza para ayudar a levantarse La paciente se mantiene de pie con más fuerza que antes
La parte superior del cuerpo era incapaz de soportarse a sí misma en la silla de ruedas Se desploma hacia el lado derecho y se cae hacia delante durante las comidas y en las tareas de cocina Se desplomaría hacia delante en las comidas y al lavar los platos	La fuerza de la parte superior del cuerpo mejoró en un 80 % Ya no se desploma nunca hacia el lado derecho Solicita que se retire el respaldo de la sillas de ruedas - ya no es necesario. Ya no requiere el reposacabezas de la silla de ruedas excepto cuando se mueve en el vehículo. 100 % mejor. Ya nunca se cae hacia delante en las comidas ni al lavar los platos
Ninguna sensibilidad en la espalda. Incapaz de sentir la ropa, el respaldo de la silla de ruedas o el arnés usado con el elevador	Ha vuelto el 80 % de la sensibilidad.

Espasmos o temblores en las piernas por la noche en la cama, a veces con una duración de cinco minutos varias veces durante la noche	Sólo muy ocasionalmente a una escala muy reducida (intensidad de los temblores reducida en un 50 %) y sólo cerca del final del momento de la dosis quincenal de MIS
Rubor en la cara por la tarde que continúa hasta la caída de la noche	Ha desaparecido casi completamente - se produce ocasionalmente cerca del final del momento de la dosis quincenal de MIS
Los pies duelen mucho, dolores de tipo quemazón "como si los pies fueran a quemarse" Incapaz de sentir la temperatura exterior en los pies	Los dolores de tipo quemazón han desaparecido completamente. Los pies responden ahora apropiadamente a la temperatura exterior (es decir, los pies están fríos cuando la temperatura del aire es fría)
Pies - total ausencia de cualquier tipo de sensibilidad en los pies	Capaz de sentir dolor apropiadamente cuando se golpean los pies, se pisan o se empujan.
Pies - incapaz de moverlos en modo alguno	50 % de mejoría. Capaz de mover todos los dedos. Todavía no hay fuerza en los pies pero hay movimiento y sensibilidad.
Piernas - incapacidad para moverlas Cuando está tumbada en la cama es incapaz de levantar o de mover las piernas en modo alguno	Capaz de juntar las rodillas Capaz de flexionar los músculos de los muslos La fuerza en los músculos de los muslos está aumentando
Área pélvica - incapaz de moverla en modo alguno	Capaz de "mover" la parte posterior para ajustar su posición en la cama y para ayudar a vestirse o a ajustar su posición en la silla de ruedas Ahora puedo "flexionar mi cadera por lo que puedo sentir los músculos" Capaz de moverse en el sitio para que el elevador pueda levantarla de la cama
Linfedema en las piernas y en los pies Lleva medias de compresión por esto	Notable disminución en la retención de líquidos. El marido aprecia que es más fácil ponerle las medias de compresión en los pies.
Manos - nada de fuerza para sujetar ni siquiera un cigarrillo o un lápiz entre los dedos. Completamente incapaz de volver a coser.	Sujetar un lápiz y escribir ha mejorado en aproximadamente un 50 %. Tres semanas después de finalizar el tratamiento: ha escrito a mano su diario durante dos horas sin problemas. Pasa tres horas al día escribiendo el diario con el ordenador sin cansancio ni problemas.
Manos - incapaz de cortar la carne en las comidas	Todavía no tiene fuerza suficiente para conseguir esto, aunque puede sujetar el cuchillo y el tenedor
Manos - incapaz de completar pequeños movimientos como abotonarse la ropa, abrochar un cinturón, atar un lazo	10 % de mejoría con los botones. Puede abrochar un cinturón.
Manos - incapaz de completar tareas de movimientos finos al vestirse como cremalleras o botones si no puede verlos (por ejemplo, detrás de la espalda)	10 % de mejoría para ser capaz de hacer esto
Manos - débiles. Incapaz de hornear y dificultad para cocinar ya que no puede mover recipientes pesados desde los fogones a la banqueta o el montaplatos. Incapaz de agitar mezclas de tartas, etc.	80 % de mejoría aunque todavía necesita ayuda con las cosas más pesadas. Nótese que aunque los antebrazos y las manos todavía están débiles, los hombros y los bíceps están más fuertes
Manos - débiles. Incapaz de abrir el grifo para lavar a mano la ropa	Ahora puede alargarse y estirarse y tiene fuerza suficiente para abrir los grifos. Tiene dolor en el brazo izquierdo debido al sobreuso ya que todavía no está totalmente fuerte.

Manos \ Brazos - débiles. Incapaz de vestirse ya que no puede ni siquiera ponerse el jersey por la cabeza. No podía levantar los brazos por encima de la cabeza.	Ahora no sólo puede ponerse sus propias prendas, sino que también puede quitárselas por encima de la cabeza.
Brazos débiles. Incapaz de cepillarse, lavarse o secarse el pelo	Ahora puede hacerlo sin ayuda.
Neuralgia facial - dosis diaria de 200 mls de Tegretol tomada durante los últimos cinco años Experimentaba ataques súbditos de "mucho mucho dolor" en varias partes de la cara "como si alguien te estuviera golpeando con una uña en la cara"	Ha dejado de tomar Tegretol dos semanas después de finalizar el tratamiento con la MIS416. Ha experimentado un breve incidente durante unos pocos segundos cinco días después de dejar el Tegretol
Dísfagia - en los dos últimos años ha experimentado problemas intermitentes al tragar - "la comida simplemente no quería bajar". Su fisio le recomendó bajar la barbilla, lo que parece ayudar	80 % de mejoría
Deglución - un problema intermitente al reír y tragar a la vez - o al respirar y reír a la vez	Ha mejorado
Vista - dificultad para enfocar < por la tarde. Un ojo no enfoca y tiene que inclinar la cabeza hacia un lado para ver a alguien que está frente a ella	100 % de mejoría una semana después de la primera dosis de MIS416
Fuerza general - se siente como una "masa de carne, incapaz de moverse"	El marido nota que ahora ayuda mucho al ponerle el arnés para levantarla de la cama. Puede mover mejor el cuerpo en el arnés y puede mover las extremidades con más facilidad.
Intestino lento. Ninguna sensibilidad. Puede estar estreñida durante hasta dos semanas y no sentir la necesidad de evacuar.	Ha mejorado mucho la sensibilidad. Ahora puede sentir la necesidad de evacuar y puede sentir la salida de las heces, aunque todavía está estreñida y necesita tomar un laxante suave.
Energía. A veces necesita dormir a las 11.00 am y de nuevo por la tarde	Mejoría apreciable. Nunca necesita dormir durante el día.

[0054] Se realizó un escáner de MRI de seguimiento 6 meses después de iniciar la terapia. Se apreció que las amplias lesiones de la EM documentadas en el escáner previo eran estables y no se identificaron lesiones adicionales.

5

EJEMPLO 6 - Inducción del interferón inmunorregulador de tipo I por parte de las células dendríticas plasmocitoides después de una estimulación *in vitro* con la micropartícula de MDP

[0055] Se purificaron potentes células productoras de INF- α humanas pDCs, a partir de PBMC mediante el uso de una selección con microesferas magnéticas de células BDCA-2+. Las células clasificadas (10^6 /ml) se cultivaron (medio completo + 5 % de suero Ab) con micropartícula de MDP o ligando A de tipo TLR9 como un control positivo del ensayo. Los sobrenadantes de cultivo se ensayaron para comprobar el contenido en IFN α mediante el uso de una metodología de citometría de flujo en matriz de microesferas. Los resultados mostrados en la figura 4 B muestran la inducción sensible a la dosis de pDC del IFN α , una citocina que ofrece un beneficio terapéutico para algunos tipos de esclerosis múltiple.

EJEMPLO 7 - Inhibición de la proliferación de linfocitos T inducida por un aloantígeno por parte del cultivo conjunto de la micropartícula de MDP

[0056] Para simular la proliferación de linfocitos T inducida por antígeno se estableció una reacción de linfocitos mixta de 2. Se obtuvieron PBMC de dos donantes de MHC I y MHC II no compatibles. Una cohorte (respondedora) se marcó con un colorante indicador fluorescente de la división celular denominado colorante CFSE (Invitrogen, EE.UU.), mientras que la otra corte permaneció sin marcar (estimuladora). Se cultivaron conjuntamente las mismas

cantidades de células estimuladoras y respondedoras en presencia de micropartícula de MDP a 10, 1 y 0,1 µg/ml con o sin CD40L soluble, un conocido factor de coestimulación de los linfocitos T, durante 5 días. Las células se marcaron con el colorante de viabilidad (yoduro de propidio; Invitrogen, EE.UU.) y anticuerpos fluorescentes reactivos con las células CD3 (Sigma-Aldrich NZ Ltd, Auckland, Nueva Zelanda). Las células se analizaron mediante una citometría de flujo y los linfocitos T vivos respondedores se identificaron basándose en la fluorescencia de CFSE / CD3. Se determinó el % que se había dividido, según lo indicaba una fluorescencia reducida de CFSE en comparación con los controles no proliferativos. Como se muestra en la Figura 5, la micropartícula de MDP inhibió la proliferación de los linfocitos T inducida por el aloantígeno en ausencia y en presencia de factores coestimulantes de los linfocitos T. Esto indica que la micropartícula de MDP también puede ser capaz de modular la proliferación de los linfocitos T autoinducida por el antígeno asociada con la esclerosis múltiple.

EJEMPLO 8 - El tratamiento con la micropartícula de MDP en el momento de la inducción de la enfermedad retrasa la velocidad de aparición y la incidencia de la enfermedad en el modelo murino de esclerosis múltiple recurrente-remitente

[0057] Se han inmunizado subcutáneamente (s.c.) ratones (n = 5) con el péptido glucoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG) (Sigma-Aldrich NZ Ltd, Auckland, Nueva Zelanda) y coadyuvante de Freund seguido de toxina tosferínica el día 2, intraperitonealmente (i.p.). La micropartícula de MDP (250 µg) se administró intravenosamente (i.v.) al mismo tiempo que la inmunización con MOG + coadyuvante de Freund. Se midió la velocidad de aparición de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) (Figura 6A) y las puntuaciones de la enfermedad (Figura 6B). Las puntuaciones de la enfermedad se usaron para calcular la carga de morbilidad (área bajo la curva; AUC; Figura 6B) y la puntuación máxima de la enfermedad (Figura 6C). Estos resultados demuestran que la administración de la micropartícula de MDP i.v. en el momento de la inmunización con el péptido MOG en coadyuvante de Freund s.c. seguido de toxina tosferínica i.p. el día 2 retrasa la aparición y reduce la incidencia de la enfermedad. Las determinaciones del AUC como una indicación de la carga de morbilidad total o "de padecimiento" muestran que los animales sin tratar tienen un valor de 31, que se reduce hasta 11,9 en los animales tratados con la micropartícula de MDP. La puntuación máxima de la enfermedad también se reduce significativamente en el grupo tratado.

EJEMPLO 9 - El tratamiento con la micropartícula de MDP antes de la inducción de la EAE mejora la fase de recuperación espontánea en el modelo murino de esclerosis múltiple recurrente-remitente

[0058] Se trataron ratones (n = 5) con 250 µg de micropartícula de MDP i.v. 3 días antes de la inducción de la EAE en un modelo recurrente-remitente según se describe en el Ejemplo 8, y se determinó la puntuación de la enfermedad. La recuperación se definió como el día en el que se producía una disminución > 1,0 en la puntuación máxima y se mantenía. Como se muestra en la Figura 7, el pretratamiento con la micropartícula de MDP mostró un aumento significativo en la velocidad de aparición de la fase de recuperación espontánea en comparación con los ratones sin tratar, que no mostraban recuperación durante el periodo de tiempo examinado. Estos resultados indican que la terapia con la micropartícula de MDP tiene la capacidad de modular la gravedad o de limitar los síntomas de la esclerosis múltiple asociados a una enfermedad activa en curso.

EJEMPLO 10 - La terapia a largo plazo con la micropartícula de MDP (MIS416) mantiene unos niveles séricos reducidos de las moléculas de adhesión celular centrales para el tráfico de leucocitos

[0059] Se obtuvieron muestras de la paciente YV como se ha descrito en el Ejemplo 4 y se incluyeron en la terapia en curso con la MIS416 hasta la semana 32. Las muestras incluidas entre la semana 1 hasta la semana 32 fueron evaluadas para determinar si la disminución en los niveles de las moléculas de adhesión solubles sE-selectina, sICAM-1 y sVCAM-1 detectadas en la semana 12 se mantenían con la terapia de la MIS416. Las muestras séricas se analizaron para comprobar las moléculas de adhesión solubles sE-selectina, sICAM-1 y sVCAM-1 simultáneamente mediante el uso de una tecnología de citometría de flujo en matriz de microesferas (Bender MedSystems GmbH, Viena, Austria). Los resultados se proporcionan en la Figura 8. Estos resultados muestran que la terapia a largo plazo de 32 semanas con la MIS416 da lugar a una reducción sostenida en los niveles previamente elevados de las moléculas de tráfico de leucocitos.

EJEMPLO 11 - El tratamiento con la micropartícula de MDP en el momento de la inducción de la enfermedad de EAE retrasa la aparición y la gravedad de la enfermedad y reduce la incidencia de la enfermedad en un estudio de repetición

[0060] Se indujo una EAE en ratones (n = 5) exactamente como en el Ejemplo 8. La micropartícula de MDP (250 µg) se administró intravenosamente (i.v.) al mismo tiempo que la inmunización con MOG + coadyuvante de Freund para inducir una EAE. Se midió la velocidad de aparición de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) y las puntuaciones de la enfermedad (Figura 9A). Se muestra el % de incidencia acumulada (Figura 9B). Las puntuaciones de la enfermedad se usaron para calcular la puntuación máxima de la enfermedad (Figura 10). Estos resultados demuestran adicionalmente que la administración de la micropartícula de MDP i.v. en el momento de la inmunización con el péptido MOG en coadyuvante de Freund s.c. seguido de toxina tosferínica i.p. el día 2, retrasa la aparición y reduce la incidencia de la enfermedad, al igual que reduce significativamente la puntuación máxima de la

enfermedad en el grupo tratado en comparación con los animales sin tratar.

EJEMPLO 12 - El tratamiento con la micropartícula de MDP en el momento de la inducción de la enfermedad de EAE aumenta los niveles de IFN- γ en el suero sanguíneo periférico

5

[0061] Se obtuvieron muestras sanguíneas mediante una hemorragia retroorbital los días 0, 4, 8, 16 y 30 de los ratones que se estudiaron en el Ejemplo 8 y en el Ejemplo 9. El suero se aísla mediante centrifugación. Se determinaron los niveles de IFN- γ mediante el uso de una citometría de flujo en matriz de microesferas específica para el IFN- γ de ratón (Bender Medsystems). Según se muestra en las Figuras 11A y B, la terapia con la micropartícula de MDP indujo unos elevados niveles de IFN- γ que se sabe que reduce la gravedad de la enfermedad en los modelos de ratón de EAE recurrente-remitente.

10

EJEMPLO 13 - El tratamiento con la micropartícula de MDP en el momento de la inducción de la enfermedad de EAE aumenta las cifras absolutas de monocitos en sangre periférica en el día 22 posterior a la inducción de la enfermedad

15

[0062] Se obtuvieron muestras sanguíneas a partir de ratones mediante una hemorragia retroorbital en el día 22 posterior a la inducción de la EAE. Los recuentos de glóbulos blancos sanguíneos totales (WBC) se realizaron sobre las muestras preparadas mediante el uso de un 2 % de acético ácido con una cantidad mínima de violeta de genciana (Sigma Aldrich) en un hemocitómetro. El % de monocitos (diferencial de glóbulos blancos sanguíneos) se determinó mediante el uso de una gota de sangre extendida en un portaobjetos seguido de una tinción de Giemsa (Sigma Aldrich). El portaobjetos se examinó mediante el uso de un microscopio y se determinó el % de monocitos con respecto a los WBC totales. Para calcular la cifra absoluta real de monocitos, los WBC se multiplicaron por el % de monocitos. La cifra absoluta de monocitos en los animales tratados con la micropartícula de MDP había aumentado significativamente en comparación con los ratones no tratados (Figura 12).

20

25

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
5
2. Una composición que comprende dipéptido de muramilo reticulado en una micropartícula para su uso en el tratamiento de los síntomas de la esclerosis múltiple en un sujeto con esclerosis múltiple.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición es para ser administrada
10 con uno o más de otros agentes activos eficaces en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
4. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el tipo de esclerosis múltiple que se va a tratar se elige de entre esclerosis múltiple progresiva y recurrente-remitente.
- 15 5. La composición para su uso de acuerdo con la 4, donde la esclerosis múltiple progresiva múltiple se selecciona de entre esclerosis múltiple progresiva primaria, progresiva secundaria o progresiva crónica.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el tipo de esclerosis múltiple que se va a tratar es la esclerosis múltiple recurrente-remitente.
20
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición es para ser administrada a un sujeto mediante un medio elegido entre intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, subcutáneo, rectal, nasal, oral, intragástrico y pulmonar.
- 25 8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición es para ser administrada a un sujeto mediante infusión o inyección.
9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la composición es para ser administrada al sujeto en un intervalo de dosificación de 50 µg a 1.500 µg.
30
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la composición es para ser administrada al sujeto diariamente, semanalmente, quincenalmente o mensualmente.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el uno o más de otros agentes activos
35 eficaces en el tratamiento de la esclerosis múltiple son para ser administrados simultáneamente o secuencialmente, en cualquier orden, con la composición.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde el uno o más de otros agentes activos
40 eficaces en el tratamiento de la esclerosis múltiple se seleccionan entre corticosteroides, interferones, acetato de glatiramer, mitoxantrona, anticuerpos o combinaciones de los mismos.

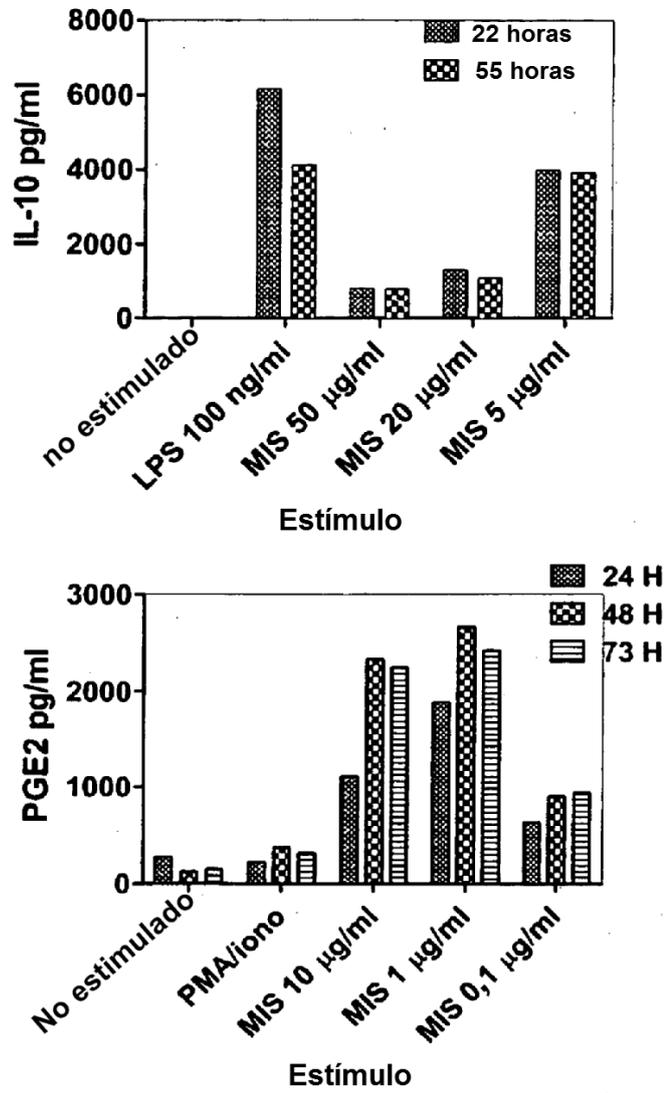
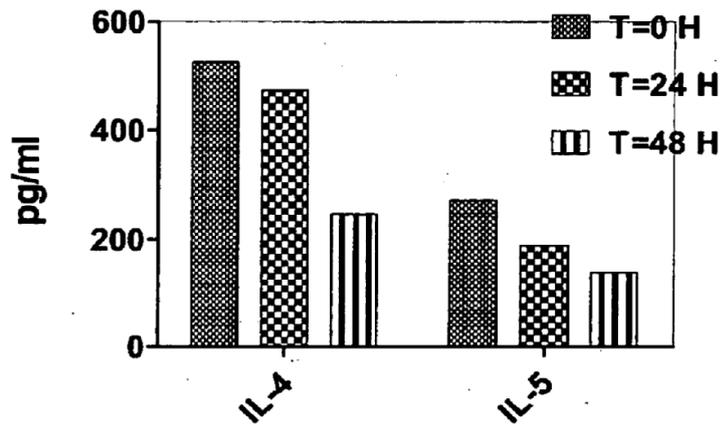


Figura 1

**Inhibición de las citocinas séricas Th2
en un paciente autoinmune después
de un único bolo i.v. de MIS**



Citocina

Figura 2

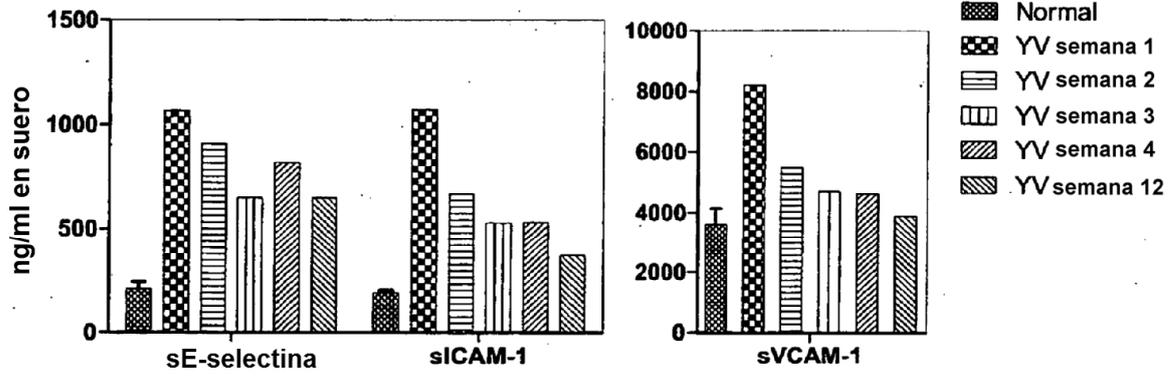


Figura 3

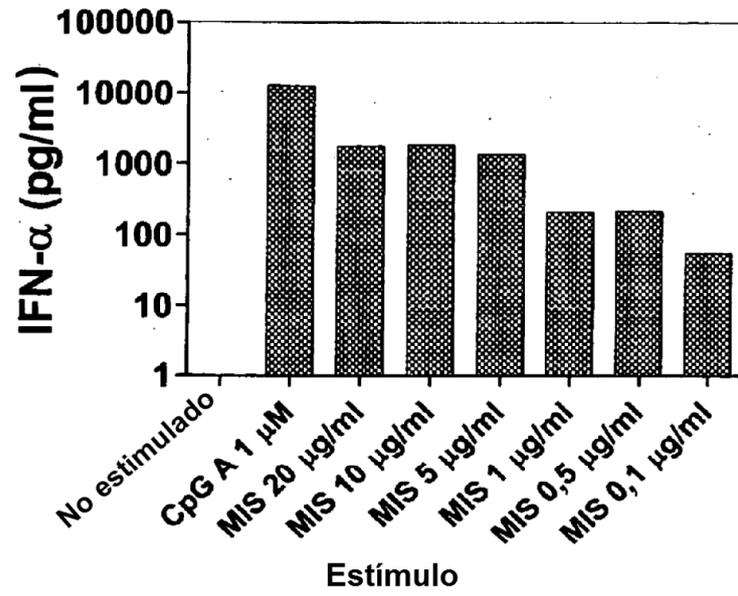


Figura 4

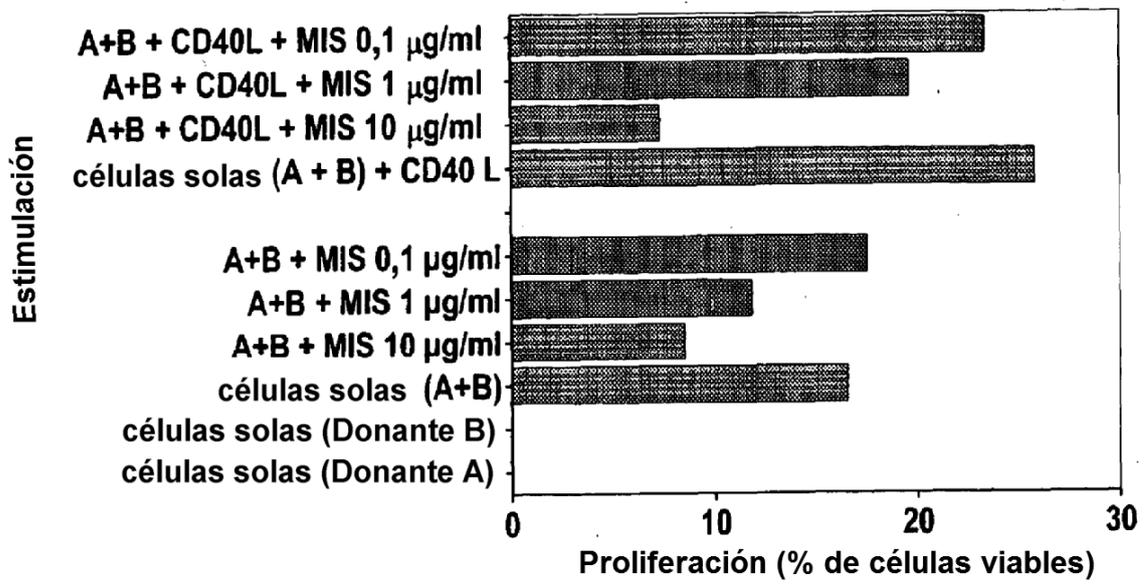


Figura 5

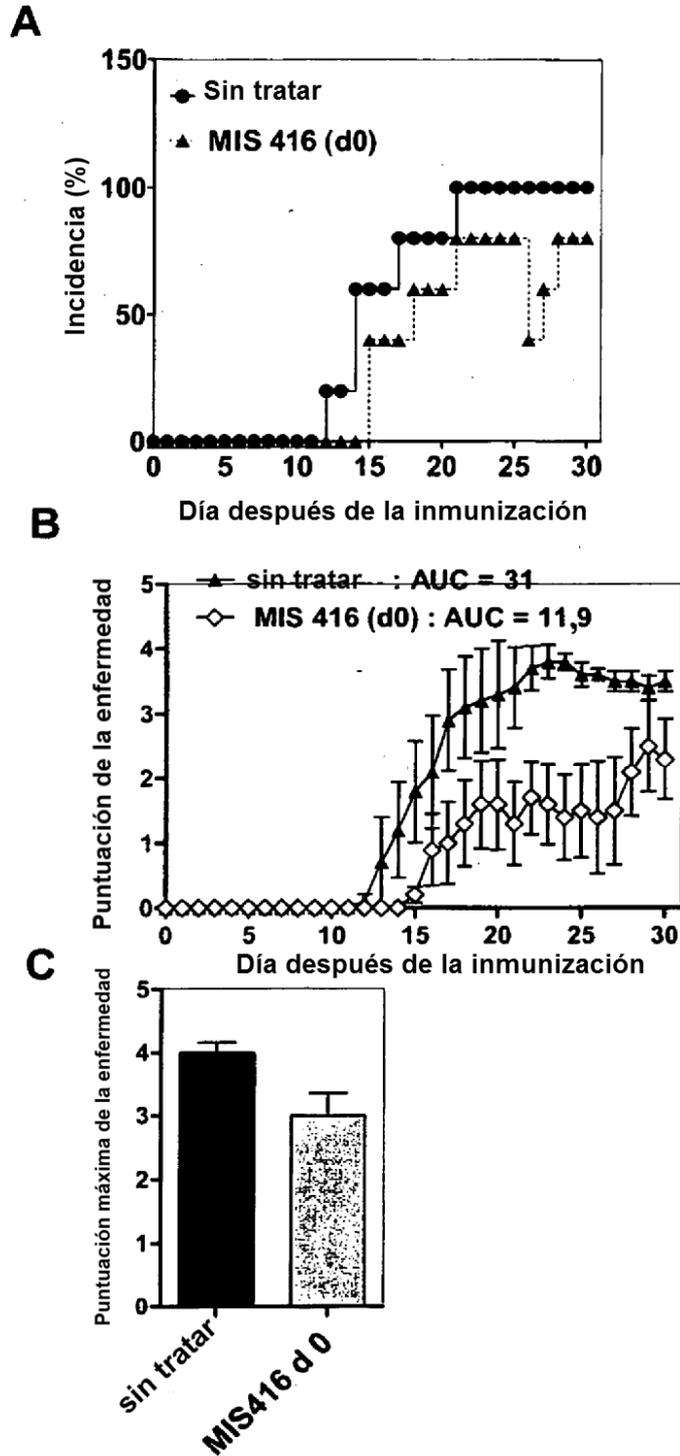


Figura 6

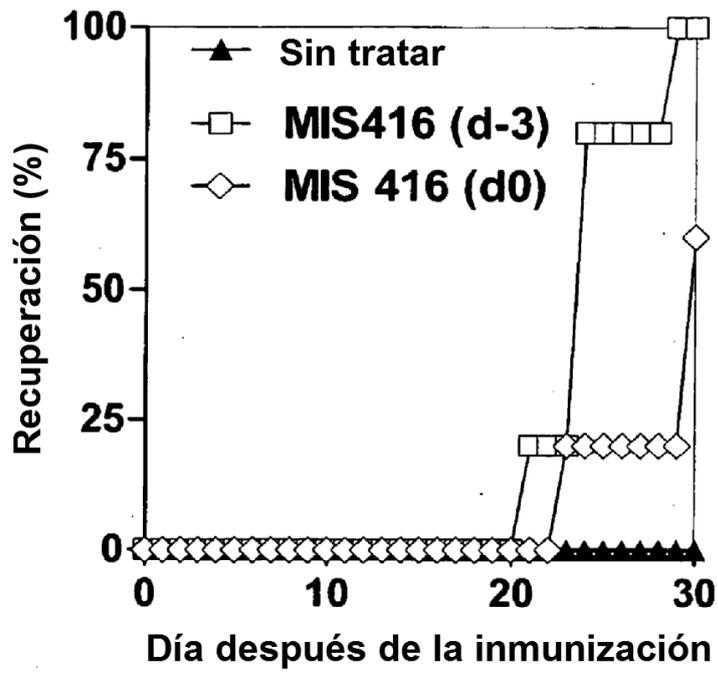


Figura 7

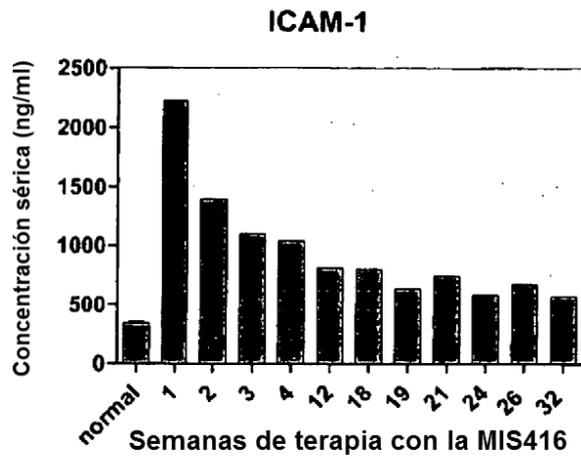
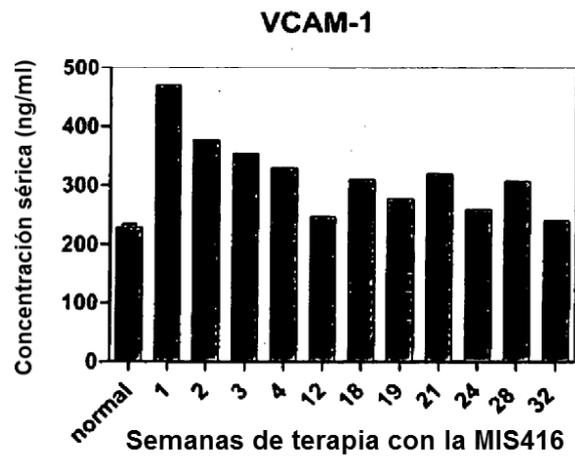
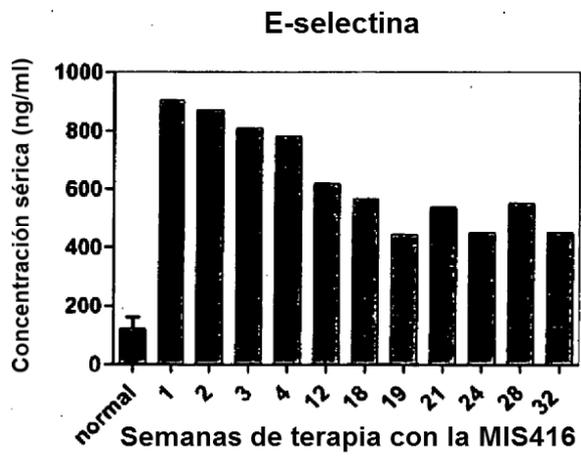
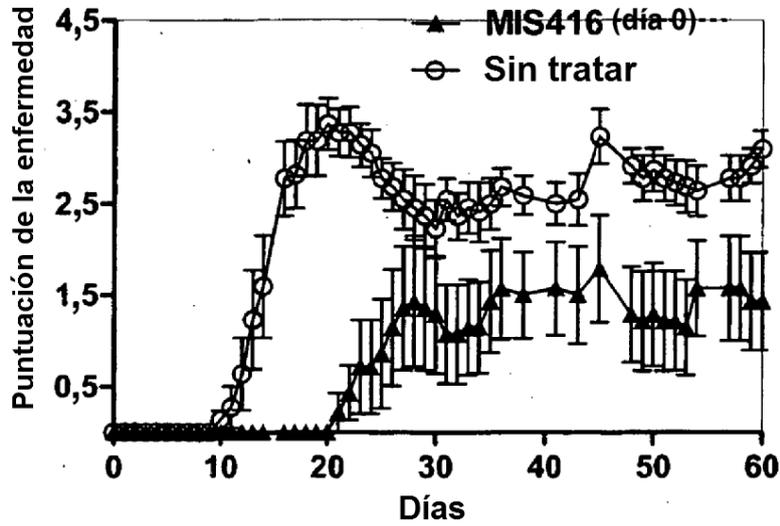


Figura 8



Experimento #2

(A)



(B)

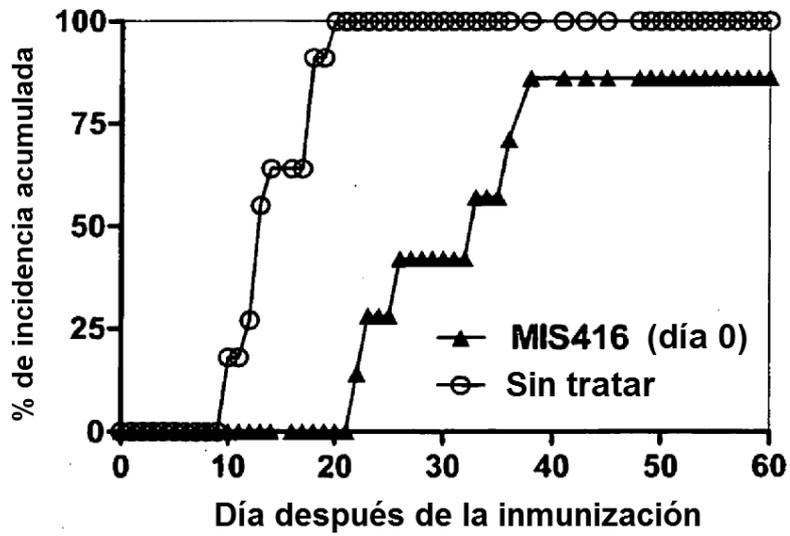
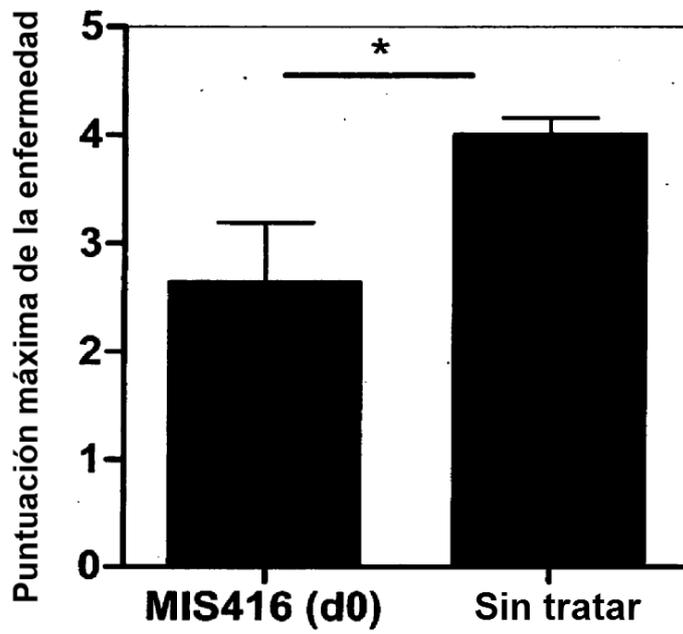


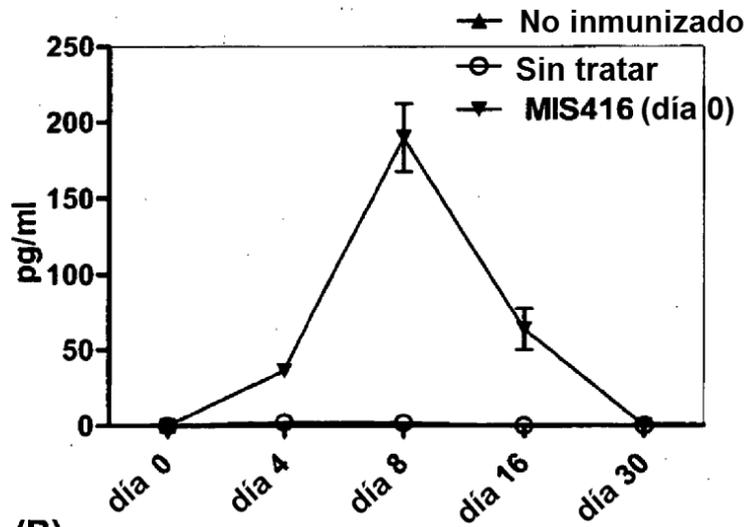
Figura 9



* $p < 0,01$ ANOVA monofactorial no paramétrico

Figura 10

(A) Experimento #1



(B)

Experimento #2

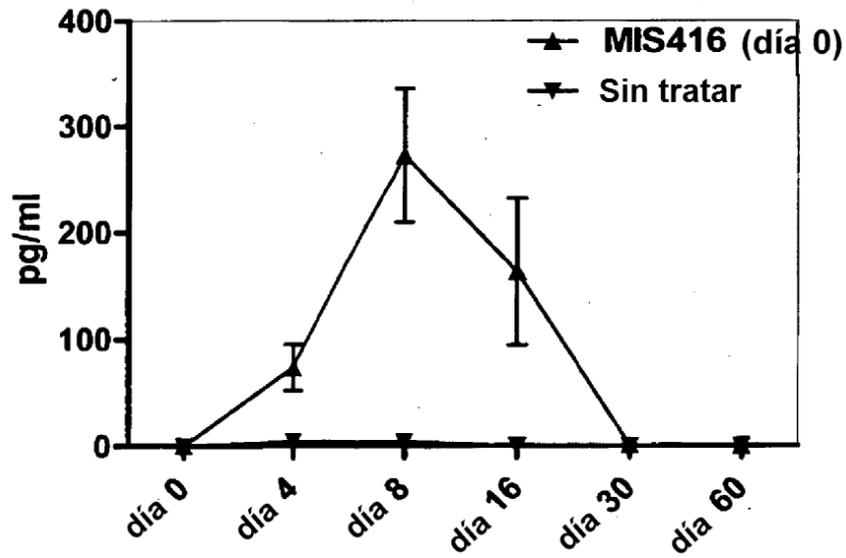
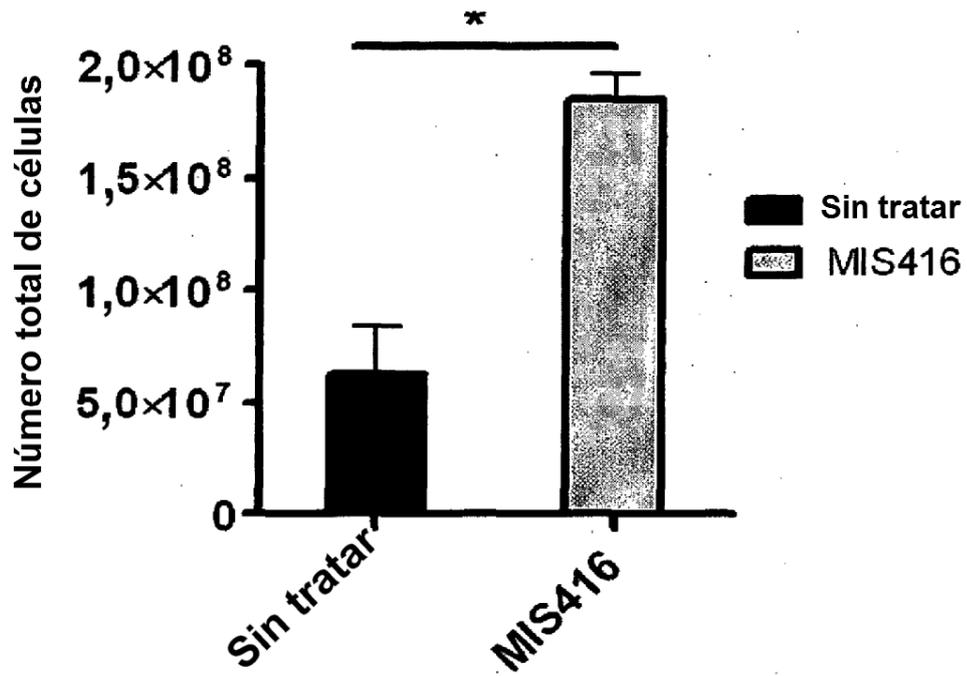


Figura 11



* $p < 0,05$ ANOVA monofactorial no paramétrico

Figura 12