



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 334**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08447031 .9**

96 Fecha de presentación : **27.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2138513**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.06.2011**

73 Titular/es: **THERANOR S.P.R.L.**  
**Cul du Bief 166**  
**4870 Trooz, BE**

72 Inventor/es: **Thiry, Michel y**  
**Marttyushev-Poklad, Andrey**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 360 334 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 farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al tratamiento y prevención de enfermedades causadas por virus de la gripe, incluyendo infecciones por virus de la gripe. Más particularmente, esta invención se refiere a nuevos agentes terapéuticos diseñados para modular la respuesta antiviral del hospedador y reducir la gravedad y duración de las enfermedades causadas por virus de la gripe.

**Técnica Antecedente**

Existen varias estrategias básicas para combatir infecciones víricas (aparte del tratamiento de los síntomas individuales): (1) vacunación —inducción de inmunidad para prevenir una infección vírica, (2) fijar como objetivo el ciclo de replicación viral con agentes moleculares pequeños o anticuerpos terapéuticos y (3) activación de la respuesta del hospedador (principalmente con el uso de interferones o inductores de interferón) WAGNER, E. K., et al. Basic Virology. 2ª edición. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. ISBN 1405103469. págs. 96-116.

Cada una de las estrategias mencionadas tiene ciertas limitaciones o desventajas. La vacunación sólo es conveniente para infecciones que pueden prevenirse con vacunas; la variabilidad natural del patógeno (por ejemplo, virus de la gripe) puede minimizar la eficacia de la vacunación; por último, la vacunación rara vez se asocia con reacciones indeseables. Cada agente terapéutico que se dirige al ciclo de replicación viral es eficaz solamente en una estrecha variedad de afecciones patológicas causadas por patógenos que comparten una diana molecular común; el uso de dichos agentes puede asociarse con el desarrollo de resistencias y/o reacciones indeseables. También es muy importante tener en cuenta que la gravedad y duración de las afecciones causadas por virus dependen de dos grupos de factores: las concentraciones de virus en los órganos diana con su efecto citopático directo correspondiente, unidas al índice de aclaramiento viral por un lado y a lo apropiado de la respuesta inmune adaptativa e innata del hospedador por otro lado. Por lo tanto, incluso una dosis relativamente baja de un virus altamente patógeno puede causar una enfermedad muy grave, siendo la gravedad con frecuencia el resultado de una "tormenta de citocinas" (SZRETTTER, K. J., et al. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenza viruses in mice. J Virol. 2007, vol. 81, nº 6, págs. 2736-44) causada por una clase de reacción inoportuna de las defensas del hospedador.

Los agentes capaces de activar la respuesta del hospedador (modificadores de la respuesta biológica, inmunomoduladores) parecen ser un grupo prometedor de agentes terapéuticos antivirales con respecto a su modo de acción "natural" e independencia de la causa particular de la infección vírica. Este grupo de agentes terapéuticos puede ejemplificarse mediante interferones (por ejemplo, interferón alfa-2a pegilado), imiquimod (inductor de interferón que actúa como un agonista del receptor tipo peaje 7), tilorona (inductor de interferón activo por vía oral). Sin embargo, todas las preparaciones de interferón conocidas tienen efectos adversos significativos y los inductores de interferón sintéticos tienen problemas de seguridad o biodisponibilidad.

Existen numerosos agentes terapéuticos que comprenden anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo diseñados para el tratamiento de diferentes enfermedades (Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. Nat Rev Drug Discov. Ene 2003; 2(1): 52-62.). Varios de ellos están diseñados para enfermedades causadas por virus; por ejemplo, en la infección por VIH, se proponen fragmentos de anticuerpo para bloquear la proteína viral gp120 (Danishefsky et al., solicitud de patente de los Estados Unidos 20060229432, publicada el 12 de octubre de 2006); en la infección por virus respiratorio sincitial (RSV) se sabe que anticuerpos monoclonales (palivizumab) se dirigen al RSV, previenen, tratan o mejoran los síntomas asociados con una infección por RSV. Los agentes mencionados están destinados a bloquear/inhibir su molécula diana, y se administran en dosis importantes (de al menos 0,001 mg/kg). Teóricamente, la técnica anterior incluye la administración oral, pero los productos existentes no pueden usarse en formas de dosificación oral debido a la escasa biodisponibilidad proporcionada por esta vía para la medicina basada en proteínas. Formulaciones farmacéuticas por vía oral menos numerosas basadas en anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (solicitudes de patente de los Estados Unidos 20060002927 (10513109), 20050136103 (10942300), 20030153022 (10287821), etc.) se dirigen a una molécula dentro del tracto gastrointestinal o a un péptido exógeno bacteriano y se administran en dosis importantes esenciales para conseguir cierta concentración en el tracto gastrointestinal y bloquear su diana.

Aparte de agentes antivirales, la técnica anterior abarca principalmente anticuerpos dirigidos a dianas moleculares que están reguladas positivamente en una afección patológica particular con la intención de disminuir su nivel hasta la normalidad. Otra estrategia general es el uso de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo para dirigirse a marcadores que se expresan específicamente por células malignas o de otro modo enfermas. Se conocen en la técnica anterior miméticos (agonistas de receptores) basados en anticuerpos, pero ninguno de ellos se usa en realidad en la práctica. El documento US2006/115475 A1 (Carton Jill M et al) propone el uso de un antagonista de anticuerpo generado contra el dominio extracelular de TLR3 que inhibe la producción celular de citocinas que están reguladas positivamente tras la activación de TLR3, para tratar una afección inflamatoria relacionada con una

infección por gripe.

Además de las estrategias antivirales mencionadas anteriormente y de numerosos agentes terapéuticos sintomáticos para las infecciones víricas, hay varios agentes medicinales homeopáticos registrados para la prevención y tratamiento de infecciones víricas, principalmente gripe y resfriado común. La mayoría de ellos se prescriben individualmente por el médico basándose en los síntomas específicos del paciente, de acuerdo con la tradición homeopática. Sin embargo, varios productos reivindican indicios universales de ser eficaces en infecciones del tracto respiratorio superior. Los más notables de los mismos son Oscillocochinum (comercializado en Francia y varios otros estados de la UE y Norteamérica) y Anaferon (comercializado en Rusia y varios estados vecinos, pero no en la UE). El Oscillocochinum está hecho de corazón e hígado de pato (dilución homeopática K200), el Anaferon está hecho de anticuerpos contra interferón gamma (mezcla de diluciones homeopáticas (RU WO2005000350A (EPSHTEIN OI) 06.01.2005). Aunque los agentes terapéuticos homeopáticos están reconocidos en general como seguros, la eficacia de los productos mencionados continúa siendo incierta, al menos a juzgar por los estudios publicados. Para el Oscillocochinum no hay pruebas de eficacia publicadas en modelos animales de infecciones víricas, y su beneficio clínico al tratamiento de la gripe y del síndrome tipo gripe se considera muy moderado (VICKERS, A. J., et al. Homoeopathic Oscillocochinum for preventing and treating influenza and influenza-like syndromes. Cochrane Database Syst Rev. Jul 2006, vol. 19, n° 3, p.CD001957.). Para el Anaferon, están publicados datos de eficacia en animales (SERGEEV, A. N., et al. [Antiviral activity of oral ultralow doses of antibodies to gamma-interferon: experimental study of influenza infection in mice]. Antibiot Khimioter. 2004, vol. 49, n° 11, p.7-11.; SUSLOPAROV, M. A., et al. [Efficacy of therapeutic and prophylactic actions of ultralow doses of antibodies to gamma-interferon in experimental murine model of herpes virus]. Antibiot Khimioter. 2004, vol. 49, n° 10, págs. 3-6.); los beneficios del producto en ensayos clínicos en seres humanos sólo pueden estimarse a partir de resúmenes de conferencias científicas.

Se propuso una estrategia general para fabricar productos homeopáticos usando "anticuerpos contra un antígeno que actúe como una causa directa de un síndrome patológico o implicado en la regulación de los mecanismos de su formación" (documento EP1295606 A (EPSHTEIN O. I.) 26.03.2003). Pero la solicitud de patente citada no sugiere ninguna pista para elegir una diana molecular particular en una enfermedad particular. Cuando se considera que están implicados cientos de proteínas en la regulación de la defensa del hospedador contra infecciones víricas (incluyendo cada una de las proteínas docenas de epítomos contra los que generar anticuerpos) se tiene que seleccionar el mejor candidato a fármaco de entre miles de opciones posibles.

### Descripción de la invención

La presente invención tiene como objetivo desarrollar un producto medicinal seguro y eficaz que pudiese actuar como inmunomodulador, activador y modulador de la respuesta del hospedador, proporcionando de este modo beneficios terapéuticos en enfermedades causadas por virus de la gripe.

### Problema técnico

Las infecciones víricas y las enfermedades causadas por virus presentan en general una necesidad médica generalmente no satisfecha: los agentes terapéuticos disponibles con una eficacia confirmada son eficaces solamente en una variedad muy estrecha de infecciones, o tienen un perfil de seguridad desfavorable, o tienden a perder eficacia debido a resistencia viral.

### Solución técnica

El problema técnico de diseñar una composición farmacéutica eficaz y segura en el tratamiento de enfermedades causadas por virus de la gripe se resuelve incorporando en dicha composición una cantidad terapéutica eficaz o formulación de anticuerpos completos o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos específicos contra la secuencia del receptor tipo peaje tipo 3 (NH<sub>2</sub>)FYWNVSVHRVLGFKC(COOH) [FYW h, SEC ID N°: 1] y, opcionalmente, contra la secuencia del receptor tipo peaje tipo 3 (NH<sub>2</sub>)EYAAYIIHAYKD(COOH) [EYA h, SEC ID N°: 2], o contra la secuencia de la cadena beta del receptor de interferón gamma (NH<sub>2</sub>)LIKYWFHTPPSIPLQIEEYL(COOH) [LIK h, SEC ID N°: 3], o contra la secuencia de la cadena alfa del receptor de interferón gamma (NH<sub>2</sub>)SIILPKSLISVV(COOH) [SII h, SEC ID N°: 4].

En otra realización de la invención, la composición farmacéutica descrita se usa como medicamento destinado a administración enteral o parenteral.

En otra realización de la invención, los fragmentos de anticuerpos usados son fragmentos Fab, F(ab)<sub>2</sub> o monómeros de anticuerpo que contienen una cadena de inmunoglobulina pesada y una ligera. Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse tratando anticuerpos completos con una endopeptidasa tal como papaína, pepsina o ficina, y también fabricarse por los métodos de la ingeniería genética.

En una de las realizaciones de la invención, se describe un método para la preparación de la composición farmacéutica que comprende al menos las etapas siguientes, ventajosamente combinadas con una o más etapas de

reducción de virus clásicas como tratamiento con ácido, nanofiltración o exposición a luz UV:

- 1) Síntesis peptídica.
- 2) Acoplamiento con hemocianina de lapa californiana.
- 3) Inmunización de un animal con conjugado de péptido-KLH.
- 4) Recogida y purificación preliminar de sueros inmunes.
- 5) Purificación por afinidad sobre proteína A.
- 6) Purificación sobre KLH-BrCN-Sepharose o purificación por afinidad sobre el péptido.
- 7) Purificación opcional por cromatografía de intercambio iónico.
- 8) Preparación de una forma de dosificación líquida o sólida.

El método puede comprender una o más etapas adicionales, tales como la adición de uno o más excipientes, etapas de granulación, etapas de preparación de comprimidos, etc.

### 15 Efectos ventajosos de la invención

Debido a que su modo de acción implica la modulación de la respuesta innata y adaptativa del hospedador contra virus de la gripe, la composición farmacéutica diseñada de acuerdo con la presente invención permite un tratamiento seguro y eficaz de afecciones causadas por virus de la gripe.

### 20 Definiciones

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, se refiere a una molécula de anticuerpo (inmunoglobulina) monoclonal o policlonal. La expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo de longitud completa (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad para unirse específicamente a una diana de interés. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo de longitud completa incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento F<sub>d</sub>, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento F<sub>v</sub> que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada que conserva su funcionalidad. Además, aunque los dos dominios del fragmento F<sub>v</sub>, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse usando métodos recombinantes mediante un enlazador sintético que permita que se generen como una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como F<sub>v</sub> de cadena sencilla (scFv). Véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883. Opcionalmente, de acuerdo con la presente invención, los anticuerpos son anticuerpos IgG, particularmente IgG1. El F(ab')<sub>2</sub> se refiere al fragmento de anticuerpo que puede obtenerse después de la escisión con pepsina y está compuesto tanto por cadenas ligeras como por partes de las cadenas pesadas unidas por disulfuro mediante la región bisagra. El fragmento Fab puede obtenerse a partir del anticuerpo intacto o a partir del F(ab')<sub>2</sub> por digestión con papaína de la región bisagra, y contiene una cadena ligera y una parte de la cadena pesada. También pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos por síntesis o por métodos recombinantes descritos en la técnica.

La "especificidad de anticuerpo" es una propiedad intrínseca de los anticuerpos que caracteriza su capacidad para unirse al epítipo correspondiente del antígeno correspondiente con una constante de afinidad (asociación) (K<sub>a</sub>) elevada. La K<sub>a</sub> para anticuerpos que pueden considerarse específicos para un antígeno particular se encuentra en el intervalo de 10<sup>5</sup> a 10<sup>10</sup> M<sup>-1</sup>. (Foote J, Eisen HN. Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. Proc Natl Acad Sci USA. 28 feb 1995; 92(5): 1254-6.). La K<sub>a</sub> puede medirse por diálisis en equilibrio o tecnología de Biacore tanto para anticuerpos monoclonales como para anticuerpos policlonales, en los que se considera el promedio de la K<sub>a</sub> de la mezcla (Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. 5<sup>a</sup> edición. Garland Science Textbooks, 2001, Apéndice I, párrafo A-9, Figura A.11).

Las vías de administración de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención incluyen las vías enteral (cualquier forma de administración que implique cualquier parte del tracto gastrointestinal de la boca al ano) o parenteral (por aplicación mediante inyección, infusión, transmucosa, transdérmica o por inhalación).

El término "formulación" en la presente invención se refiere a "el producto de un proceso por el que una sustancia farmacológica se combina con diferentes sustancias químicas para producir un producto medicinal".

### 60 Mejor modo de llevar a cabo la invención

El mejor modo de llevar a cabo la presente invención se ilustra en los ejemplos a continuación.

**Ejemplo 1. Preparación de la composición farmacéutica**

El proceso de fabricación incluye las etapas básicas siguientes, la inactivación de agentes oportunistas y las etapas de eliminación no se mencionan:

- 1) Síntesis peptídica.
- 2) Acoplamiento con KLH.
- 3) Inmunización de conejos con conjugado de péptido-KLH.
- 4) Recogida y purificación preliminar de sueros inmunes (precipitación con sulfato de amonio).
- 5) Purificación con proteína A para eliminar las proteínas que no sean IgG.
- 6) Purificación sobre KLH-BrCN-Sepharose para eliminar anticuerpos anti-KLH. Como alternativa, en esta etapa puede realizarse purificación por afinidad sobre el péptido diana, así como una cromatografía de intercambio iónico adicional.
- 7) Fragmentación (usando endopeptidasa con eliminación posterior de porciones Fc —para producir fragmentos Fab, F(ab)<sub>2</sub>, o por reducción y S-alkilación de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas —para producir mitades de anticuerpo). La etapa 7 es opcional.
- 8) Preparación de una forma de dosificación sólida o líquida de acuerdo con la farmacopea homeopática.

Las composiciones farmacéuticas preparadas de este modo contienen una cantidad terapéutica eficaz o cantidad de uno o más anticuerpos policlonales de conejo completos o fragmentos Fab de anticuerpos contra péptidos seleccionados del grupo que consiste en: secuencia del receptor tipo peaje tipo 3 (NH<sub>2</sub>)FYWNVSVHRVLGFKE(COOH) [FYW h, SEC ID N°: 1].

**Ejemplo 2. La eficacia de las composiciones farmacéuticas en un modelo animal de infección vírica**

La eficacia de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención basadas en anticuerpos y fragmentos de anticuerpo específicos se evaluó en un modelo murino de resistencia a la gripe del hospedador, y se comparó con la eficacia de composiciones no de acuerdo con la invención.

Las sustancias de partida siguientes (se usaron homólogos de ratón de los péptidos diana humanos respectivos para generar los anticuerpos) se ensayaron después de diluirse con agua de acuerdo con la tecnología homeopática; la concentración del agente activo en la formulación de solución de agua era inferior al 0,1%: Anticuerpos policlonales de conejo completos y fragmentos Fab de anticuerpos contra péptidos.

- 1) FYWNVSVHRILGFKE ('FYW') del receptor tipo peaje 3 (invención) (FYW m, SEC N°: 5);
- 2) EYTAYIIHAHKD ('EYT') del receptor tipo peaje 3 (no de acuerdo con la invención reivindicada) (EYT m, SEC ID N°: 6);
- 3) KYWFQAPPNIPEQIEEYL ('KYW') receptor de interferón gamma 2 (no de acuerdo con la invención reivindicada) (KYW m, SEC ID N°: 7);
- 4) SIMLPKSLLSVV ('SIM') del receptor de interferón gamma 1 (no de acuerdo con la invención reivindicada) (SIM m, SEC ID N°: 8);
- 5) MASGYDKPHMLVD ('MAS') del receptor de interferón gamma 1 (no de acuerdo con la invención) (MAS, SEC ID N°: 9);
- 6) LEERDFEAGVLG ('LEE') del receptor tipo peaje 3 (no de acuerdo con la invención) (LEE, SEC ID N°: 10);
- 7) Anticuerpos policlonales de conejo completos contra interferón gamma de ratón (IFNg) (no de acuerdo con la invención);
- 8) Suero preinmune de conejo (control negativo).

Los agentes se diluyeron 1:2 en agua de bebida y se proporcionó acceso libre durante 5 días antes y 10 días después de la exposición viral a ratones hembra Balb/c (8 semanas de edad, 14-20 g). Los ratones del grupo de control positivo recibieron dos dosis intranasales de Interferón Alfa (IFNa) de Ratón Recombinante, 4 x 10<sup>3</sup> U/ratón, 2 X (24 horas y 4 horas antes de la infección).

El día 0, los animales se anestesiaron con isoflurano y se infectaron por vía intranasal con virus de la gripe adaptados a ratón como una dilución 10<sup>-2</sup> del virus de reserva (aproximadamente 4 x 10<sup>4</sup> unidades formadoras de placas) en un volumen de 50 µl (50 microlitros).

Comenzando el día antes de la exposición viral, se evaluó el peso corporal y el estado clínico diariamente para cada ratón. Las puntuaciones de las observaciones clínicas eran de 0 (sano), 1 (pelaje ligeramente erizado), 2 (pelaje erizado), 3 (pelaje erizado/postura encorvada), 4 (moribundo/muerto).

La eficacia de los agentes ensayados se juzgó mediante los criterios de valoración siguientes: (1) duración de la infección clínica (número de días con puntuación de observación clínica >0); (2) gravedad global de la infección clínica (suma de puntuaciones clínicas a lo largo del seguimiento). La significación estadística de las diferencias a lo largo de todos los grupos ensayados se evaluó mediante ANOVA y se usó la prueba de Turkey para evaluar diferencias intergrupales para datos emparejados. El ANOVA para ambos criterios de valoración mostró que la diferencia en resultados entre los grupos era estadísticamente significativa. Se enumera en la Tabla 1 a continuación

los resultados detallados.

**Tabla 1**

Grupo (n)	Duración de la enfermedad, días (M ± ETM)	Valor P frente a control negativo	Gravedad de la enfermedad, puntuación (M ± ETM)	Valor P frente a control negativo
Control negativo (40)	5,93 ± 0,11	-	8,05 ± 0,29	-
IFNa (20)	4,60 ± 0,23	<0,001	4,80 ± 0,23	<0,001
Ab* completo FYW (20)	5,25 ± 0,13	0,002	6,35 ± 0,44	0,01
Fab FYW (20)	5,15 ± 0,08	<0,001	7,15 ± 0,37	0,648
Ab completo EYT (20)	5,40 ± 0,12	0,051	6,65 ± 0,36	0,08
Fab EYT (20)	5,35 ± 0,13	0,016	7,10 ± 0,45	0,572
Ab completo KYW (20)	5,35 ± 0,11	0,019	7,15 ± 0,37	0,648
Ab completo SIM (20)	5,25 ± 0,10	0,002	6,60 ± 0,34	0,058
Ab completo IFNg (20)	5,45 ± 0,12	0,118	7,90 ± 0,42	0,999
Ab completo LEE (20)	6,10 ± 0,07	-	8,60 ± 0,20	-
Ab completo MAS (20)	5,40 ± 0,14	>0,05	7,30 ± 0,42	>0,05

\* - Ab representa "anticuerpo".

5 Los descubrimientos demuestran que, bastante inesperadamente, el uso de anticuerpos completos y fragmentos Fab de anticuerpos contra varios péptidos diana (FYW) ya en forma de composiciones altamente diluidas puede producir una reducción significativa de la gravedad y/o duración de la infección clínica en un modelo de resistencia del hospedador a gripe en ratones (gripe moderada con pérdida de peso corporal >10%), que reproduce más estrechamente la enfermedad humana correspondiente.

10 La elección de la diana peptídica correcta para anticuerpos parece ser crucial para la eficacia, ya que ni el producto abarcado por el documento WO2005000350 A (EPSHTEIN OI) 06.01.2005 y también mencionado en el documento EP1295606 A (EPSHTEIN O.I.) 26.03.2003, ni anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpo dirigidos contra los péptidos LEE y MAS mostraron ningún efecto terapéutico significativo en el modelo.

15 Los descubrimientos para ratones con el tratamiento con composiciones de acuerdo con la invención pueden extrapolarse al tratamiento de seres humanos para tratar una enfermedad causada por virus de la gripe.

### 20 Ejemplo 3. La eficacia de diferentes vías de administración

La eficacia de composiciones farmacéuticas basadas en anticuerpos usadas con dos vías de administración diferentes se evaluó en un modelo de ratón de resistencia del hospedador a la gripe.

25 Se ensayaron las muestras siguientes (designación de la diana peptídica como en el Ejemplo 2):

Muestra 1. Anticuerpos completos contra péptido FYW, diluido con solución salina. Esta formulación se administró en dos inyecciones peritoneales (10 ng/kg cada una): 24 horas antes y 24 horas después de la exposición viral.

30 Muestra 2. Anticuerpos completos contra péptido FYW, diluidos con solución salina, concentración de 10 ng/ml. Esta formulación se administró por vía intranasal, 0,05 ml (0,5 ng)/ratón dos veces al día durante 5 días antes y durante 10 días después de la exposición viral.

Muestra 3. Suero preinmune de conejo (control negativo), formulado y administrado como la Muestra 1.

35 Muestra 4. Suero preinmune de conejo (control negativo), formulado y administrado como la Muestra 2.

Los ratones del grupo de control positivo recibieron dos dosis intranasales de Interferón Alfa (IFNa) de Ratón Recombinante,  $4 \times 10^3$  U/ratón, 2 X (24 horas y 4 horas antes de la infección).

40 Se anestesiaron ratones hembra Balb/c (8 semanas de edad, 14-20 g) con isoflurano y se infectaron por vía intranasal con virus de la gripe adaptado a ratón como una dilución  $10^{-2}$  del virus de reserva (aproximadamente  $4 \times 10^4$  unidades formadoras de placas) en un volumen de 50  $\mu$ l.

El curso clínico de la infección se controló diariamente, usándose la misma puntuación y criterios de valoración que en el Ejemplo 2. Se enumeran los resultados detallados en la Tabla 2 a continuación.

5

**Tabla 2**

Grupo (n)	Duración de la enfermedad, días (M ± ETM)	Valor P frente al control negativo correspondiente	Gravedad de la enfermedad, puntuación (M ± ETM)	Valor P frente al control negativo
Control negativo -muestra 3 (20)	5,98 ± 0,10	-	8,08 ± 0,21	-
Control negativo -muestra 4 (20)	6,04 ± 0,15	-	8,25 ± 0,32	-
IFNA (20)	4,65 ± 0,21	<0,001	4,83 ± 0,20	<0,001
Ab completo FYW intraperitoneal - muestra 1 (20)	5,20 ± 0,15	0,002	6,31 ± 0,41	0,01
Ab completo FYW intranasal - muestra 2 (20)	5,26 ± 0,17	0,005	6,37 ± 0,44	0,01

Los descubrimientos muestran que anticuerpos completos contra un péptido TLR3 específico con tanto vía intraperitoneal (en la dosis de 10 ng/kg) como con formulación intranasal (en la dosis de 0,5 ng/ratón) son eficaces en el tratamiento de gripe no letal en ratones.

10

La eficacia de la composición de la invención se observó también con mayores dosis terapéuticas.

#### **Modo o modos de llevar a cabo la invención**

15

El uso de composiciones altamente diluidas de anticuerpos completos contra los péptidos diana reivindicados no es el único modo de llevar a cabo la invención, sin embargo, las ventajas evidentes de esta estrategia son la rentabilidad (debido a la simplicidad relativa de la fabricación y al ahorro de la sustancia de partida) y seguridad intrínsecas al producto medicinal resultante destinado a administración oral.

20

Como alternativa al modo de llevar a cabo la invención descrito en los ejemplos anteriores, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpo mediante los métodos de ingeniería genética.

#### **Aplicación industrial**

25

La presente invención puede aplicarse a la fabricación de composiciones farmacéuticas eficaces y seguras y a medicamentos para el tratamiento de enfermedades causadas por virus de la gripe.

**Lista de secuencias**

En la memoria descriptiva, los aminoácidos de los péptidos se escriben usando las abreviaturas cortas (véase, por ejemplo, la Wikipedia, Lista de aminoácidos convencionales).

5

110: FYWh

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

10

160: Sec ID N°: 1

211: 15

212: secuencia peptídica

213: humano

15

400:

**(NH<sub>2</sub>) Phe Tyr Trp Asn Val Ser Val His Arg Val Leu Gly Phe Lys Glu (COOH)**

1

5

10

15

20

110: EYA h

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

160: Sec ID N°: 2

25

211: 12

212: secuencia peptídica

213: humano

30

400:

**(NH<sub>2</sub>) Glu Tyr Ala Ala Tyr Ile Ile His Ala Tyr Lys Asp (COOH)**

1

5

10

35

110: LIK h

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

160: Sec ID N°: 3

40

211: 20

212: secuencia peptídica

213: humano

45

400:

**(NH<sub>2</sub>) Leu Ile Lys Tyr Trp Phe His Thr Pro Pro Ser Ile Pro Leu Gln Ile**

1

5

10

15

**Glu Glu Tyr Leu (COOH)**

20

50

110: SII h

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

160: Sec ID N°: 4

211: 12

212: secuencia peptídica  
213: humano

400:

5

**(NH<sub>2</sub>) Ser Ile Ile Leu Pro Lys Ser Leu Ile Ser Val Val (COOH)**

**1 5 10**

110: FYWm

10

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

160: Sec ID N°: 5

15

211: 15  
212: secuencia peptídica  
213: ratón

400:

**(NH<sub>2</sub>) Phe Tyr Trp Asn Val Ser Val His Arg Ile Leu Gly Phe Lys Glu (COOH)**

20

**1 5 10 15**

110: EYT m

25

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

160: Sec ID N°: 6

30

211: 12  
212: secuencia peptídica  
213: ratón

400:

**(NH<sub>2</sub>) Glu Tyr Thr Ala Tyr Ile Ile His Ala His Lys Asp (COOH)**

**1 5 10**

35

110: KYWm

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

40

160: Sec ID N°: 7

211: 18  
212: secuencia peptídica  
213: ratón

45

400:

**(NH<sub>2</sub>) Lys Tyr Trp Phe Gln Ala Pro Pro Asn Ile Pro Glu Gln Ile Glu Glu**

**1 5 10 15**

**Tyr Leu (COOH)**

50

110: SIM m

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

160: Sec ID N°: 8

211: 12  
 212: secuencia peptídica  
 213: ratón

5

400:

**(NH<sub>2</sub>) Ser Ile Met Leu Pro Lys Ser Leu Leu Ser Val Val (COOH)**

1

5

10

10

110: MAS

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

160: Sec ID N°: 9

15

211: 12  
 212: secuencia peptídica  
 213: humano

20

400:

**(NH<sub>2</sub>) Met Ala Ser Gly Tyr Asp Lys Pro His Met Leu Cal Asp (COOH)**

1

5

10

25

110: LEE m

120: Composiciones farmacéuticas de anticuerpos para enfermedades causadas por virus

160: Sec ID N°: 10

30

211: 12  
 212: secuencia peptídica  
 213: ratón

35

400:

**(NH<sub>2</sub>) Leu Glu Glu Arg Asp Phe Glu Ala Gly Val Leu Gly (COOH)**

1

5

10

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de una enfermedad causada por virus de la gripe en seres humanos, conteniendo dicha composición una cantidad terapéutica eficaz o formulación de anticuerpos completos o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos específicos contra la secuencia peptídica del receptor tipo peaje tipo 3  
5 (NH<sub>2</sub>)FYWNVSVHRVVGFKK(COOH),  
que activa la respuesta antiviral del hospedador y reduce la gravedad y duración de infecciones víricas.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso como un medicamento destinado a  
10 administración enteral incluyendo administración oral, y a administración parenteral incluyendo administración sublingual.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que los fragmentos de anticuerpo son Fab, fragmentos F(ab)<sub>2</sub> o monómeros de anticuerpo que contienen una cadena inmunoglobulina pesada y una ligera.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que se obtienen fragmentos de anticuerpo por  
15 tratamiento de anticuerpos completos con una endopeptidasa tal como papaína, pepsina o ficina.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que se obtienen anticuerpos o fragmentos de anticuerpo mediante los métodos de ingeniería genética.
6. Un método para la preparación de la composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende al menos  
20 las etapas siguientes:
- 1) Síntesis peptídica.
  - 2) Acoplamiento con KLH.
  - 3) Inmunización de un animal de laboratorio con conjugado de péptido-KLH.
  - 4) Recogida y purificación preliminar de sueros inmunes.
  - 5) Purificación por afinidad sobre proteína A o G o ligando de unión a inmunoglobulina.
  - 25 6) Purificación sobre KLH-BrCN-Sepharose o purificación por afinidad sobre el péptido con purificación de intercambio iónico opcional.
  - 7) Preparación de una forma de dosificación sólida o líquida.