

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 743**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2009 E 09701377 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2229179**

54 Título: **sLDLR en la hepatitis vírica**

30 Prioridad:

07.01.2008 IL 18862808

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

11.04.2013

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
At the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot , IL**

72 Inventor/es:

**RUBINSTEIN, MENACHEM;
WERMAN, ARIEL y
ALKAHE, BEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 400 743 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

sLDLR en la hepatitis vírica.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso terapéutico del receptor soluble de LDL (sLDLR; del inglés, soluble LDL receptor) en la hepatitis vírica, especialmente la infección por el virus de la hepatitis B (HBV; del inglés, hepatitis B virus).

Antecedentes de la invención

10 El colesterol, un componente de todas las membranas plasmáticas eucarióticas, es esencial para el crecimiento y la viabilidad de las células en los organismos superiores. Sin embargo, unos niveles séricos elevados de colesterol causan enfermedad y muerte al contribuir a la formación de placas ateroscleróticas en las arterias de todo el cuerpo. En los mamíferos, el principal sitio de síntesis de colesterol es el hígado. También se forman cantidades apreciables de colesterol en el intestino. La velocidad de formación de colesterol por estos órganos es muy sensible a la cantidad de colesterol absorbida de fuentes dietéticas. Las células de fuera del hígado y del intestino obtienen colesterol del plasma en lugar de sintetizarlo *de novo*. El colesterol y otros lípidos son transportados en los fluidos corporales por lipoproteínas, que se clasifican de acuerdo con una densidad creciente. Una lipoproteína es una partícula que consiste en un núcleo de lípidos hidrófobos rodeado de una envoltura de lípidos polares y apoproteínas. Estas lipoproteínas tienen dos funciones: solubilizan lípidos muy hidrófobos y contienen señales que regulan el movimiento de lípidos particulares dentro y fuera de células y tejidos diana específicos. El colesterol es transportado en los fluidos corporales por lipoproteínas de baja densidad (LDL; del inglés, low-density lipoproteins), que se unen a un receptor específico presente en la membrana plasmática de células no hepáticas. El complejo de receptor-LDL se internaliza luego en las células mediante un mecanismo de transporte conocido como endocitosis mediada por receptor (Goldstein et al., 1979). El receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) es el prototipo de una familia de receptores de superficie celular estructuralmente relacionados que median en la endocitosis de múltiples ligandos en células de mamífero.

25 La secuencia de nucleótidos de un cDNA clonado de 5,3 kilobases para el receptor de LDL humano reveló cinco dominios estructurales, algunos de los cuales comparten una homología de secuencia con otras proteínas. Su dominio NH₂-terminal de unión a ligandos consiste en 322 restos, que incluyen 47 restos de cisteína. Este dominio va seguido de cuatro dominios adicionales: el primero consiste en aproximadamente 350 restos de aminoácido y es homólogo al receptor de EGF, el segundo consiste en 48 restos de aminoácido ricos en azúcares O-enlazados, el tercero es un único dominio transmembranal de 22 restos de aminoácido, y el cuarto es un dominio citoplásmico de 50 restos de aminoácido (Yamamoto et al., 1984).

35 A partir del sobrenadante del cultivo de células inducidas con interferón (Fischer et al., 1993) y en fluidos corporales (Fischer et al., 1994) se identificó y aisló una forma soluble del LDLR, sLDLR, que presentaba actividad antiviral. Se han identificado varias proteínas inducidas por interferón que contribuyen a la inducción del estado antivírico por IFNs. Una de dichas proteínas que presentaba actividad antivírica se producía y acumulaba en el sobrenadante del cultivo de células WISH amnióticas humanas. Esta proteína fue purificada hasta homogeneidad y fue identificada como el sLDLR (véanse el Documento EP 0553667 y Fischer et al., 1993). Se halló que el sLDLR era secretado al medio por células de mamífero que pasan a un estado antivírico en respuesta al interferón. Por contraste con el interferón, el sLDLR no induce un estado antivírico en las células pero es antivírico en sí mismo. Se halló que aparentemente el sLDLR ha de estar presente durante todo el proceso de replicación, maduración y gemación víricas, lo que sugiere que podría estar implicado en un proceso complejo que condujera a la inhibición de la ensambladura o la gemación del virus (datos no publicados). Se ha mostrado recientemente que la endocitosis del virus de la hepatitis C es mediada por receptores de LDL presentes en células cultivadas (Agnello et al., 1999).

45 El daño o la lesión hepáticos pueden tener diversas causas. Se pueden deber, por ejemplo, a infecciones víricas o bacterianas, abuso del alcohol, trastornos inmunológicos o cáncer.

Las hepatitis víricas debidas al virus de la hepatitis B y al virus de la hepatitis C son enfermedades maltratadas que afectan a un gran número de personas de todo el mundo. El número de virus de hepatitis conocidos crece constantemente. Aparte de los virus de las hepatitis B y C, se han descubierto hasta ahora al menos otros cuatro virus, llamados virus de las hepatitis A, D, E y G, que causan hepatitis asociadas a virus.

50 La lamivudina (3TC), de nombre comercial Epivir, un tratamiento anti-HIV, ha sido también aprobada para el tratamiento de la hepatitis B. Ciertos estudios han mostrado que el Epivir puede reducir la cantidad de virus de la hepatitis B hasta niveles muy pequeños, aunque este efecto no dura para siempre.

El Adefovir Dipivoxil (ADV) es otro tratamiento contra el HIV del que se ha mostrado que es eficaz en la hepatitis B crónica.

55 Yamamoto et al., 2006, se dirigen a la caracterización de interacciones de receptores de lipoproteínas de baja densidad y ligandos mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia.

Yamamoto et al., 2007, describen la unión, específica de isoformas de la apolipoproteína E, al receptor de lipoproteínas de baja densidad.

Compendio de la invención

5 La presente invención se basa en el hallazgo de que el sLDLR es eficaz para el tratamiento y/o la prevención de infecciones hepáticas causadas por el HBV.

Un primer objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo medio para tratar y/o prevenir infecciones hepáticas causadas por el HBV. Por lo tanto, la invención se refiere al uso de un sLDLR para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la hepatitis vírica causada por el HBV.

10 Con objeto de aplicar estrategias terapéuticas génicas para suministrar el sLDLR al hígado, otros aspectos de la invención se refieren al uso de vectores de expresión que comprenden la secuencia de codificación de un sLDLR, para uso en el tratamiento y/o la prevención de los estados morbosos. La invención se refiere además al uso de la activación de sLDLRs por genes endógenos y al uso de células genéticamente modificadas para que expresen sLDLRs, para la prevención y/o el tratamiento de la infección hepática causada por el HBV.

Descripción de la invención

15 La presente invención se basa en el hallazgo de un efecto beneficioso de un sLDLR en la hepatitis vírica, en particular en la hepatitis causada por el virus HBV.

De acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, se usa el sLDLR para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una infección vírica del hígado causada por el HBV.

20 De acuerdo con la invención, también se utilizan sLDLRs para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la hepatitis crónica activa, también llamada hepatitis crónica agresiva. Es una inflamación continua del hígado que daña las células hepáticas. Las causas de la hepatitis crónica activa incluyen la infección vírica y otras. La enfermedad se caracteriza por necrosis o muerte de células hepáticas, inflamación activa, y fibrosis que puede conducir a insuficiencia hepática, cirrosis y muerte. La incidencia es 1 caso por cada 10.000 personas. Son factores de riesgo las enfermedades autoinmunes, una infección previa con hepatitis C, o un antígeno positivo de hepatitis A o hepatitis B durante más de 6 meses.

25 La hepatitis crónica persistente es una forma benigna y no progresiva de inflamación hepática, y es también una enfermedad abarcada por la expresión "infección hepática" de acuerdo con la presente invención.

30 Los ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden utilizar para obtener muteínas de polipéptidos o proteínas sLDLR para uso en la presente invención incluyen cualesquier operaciones de método conocidas, tales como las presentadas en las patentes de EE.UU. RE 33.653, 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, concedidas a Mark et al.; 5.116.943, concedida a Koths et al.; 4.965.195, concedida a Namen et al.; 4.879.111, concedida a Chong et al.; y 5.017.691, concedida a Lee et al.; y las proteínas con sustitución de lisina presentadas en la patente de EE.UU. n° 4.904.584 (Shaw et al.).

35 La expresión "proteína fusionada" se refiere a un polipéptido que comprende un sLDLR, o un sLDLR vírico, o una muteína o fragmento del mismo, fusionado con otra proteína que, por ejemplo, presenta un tiempo de permanencia prolongado en fluidos corporales. De este modo, se puede fusionar un sLDLR con otra proteína, polipéptido o similar, tal como, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

40 Los "derivados funcionales", como se emplean en esta memoria, abarcan derivados de sLDLRs y sus muteínas y proteínas fusionadas, que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales que aparecen como cadenas laterales de los restos o los grupos N- o C-terminales por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención con tal de que se mantengan farmacéuticamente aceptables, es decir, que no destruyan la actividad de la proteína, que es sustancialmente similar a la actividad del sLDLR, y no confieran propiedades tóxicas a las composiciones que los contienen.

45 Estos derivados pueden incluir, por ejemplo, cadenas laterales de polietilenglicol, que pueden enmascarar sitios antigénicos y prolongar la permanencia de un sLDLR en fluidos corporales. Otros derivados incluyen ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoníaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acílicos de grupos amino libres de los restos de aminoácido, formados con componentes acílicos (por ejemplo, grupos alcanilo o aroilo carbocíclico), o derivados O-acílicos de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de restos de serilo o treonilo), formados con componentes acílicos.

50 Las "fracciones activas" de unas muteínas y proteínas fusionadas de sLDLR abarcan cualesquier fragmentos o precursores de la cadena polipeptídica de la molécula de proteína, solos o junto con moléculas asociadas o restos enlazados a los mismos, tales como, por ejemplo, restos de azúcar o de fosfato, o agregados de la molécula de proteína o los restos de azúcar solos, con tal de que dicha fracción tenga una actividad sustancialmente similar a la del sLDLR.

En una realización muy preferida de la presente invención, el sLDLR empleado es un sLDLR, o una isoforma, una muteína, una proteína fusionada, un derivado funcional, una fracción activa o un derivado circularmente permutado de los mismos. Estas isoformas, muteínas, proteínas fusionadas o derivados funcionales conservan la actividad biológica del sLDLR y preferiblemente tienen esencialmente al menos una actividad similar a la del sLDLR. Idealmente, dichas proteínas tienen una actividad biológica que está incluso aumentada en comparación con la del sLDLR no modificado. Las fracciones activas preferidas tienen una actividad que es mejor que la actividad del sLDLR, o tienen otras ventajas, como una estabilidad mejor o una toxicidad o una inmunogenicidad menores, o son más fáciles de producir en grandes cantidades, o más fáciles de purificar.

Los derivados funcionales de sLDLR se pueden conjugar con polímeros con objeto de mejorar las propiedades de la proteína, tales como la estabilidad, la semivida, la biodisponibilidad, la tolerancia por el cuerpo humano o la inmunogenicidad. Para alcanzar este objetivo, se puede enlazar el sLDLR con, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). La PEGilación se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos, descritos, por ejemplo, en el Documento WO 92/13095.

Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, el sLDLR empleado está PEGilado.

En otra realización preferida de la invención, el sLDLR empleado es una proteína fusionada que comprende todo, o parte de, un sLDLR, que está fusionado con toda, o parte de, una inmunoglobulina. La persona experta en la técnica entenderá que la proteína de fusión resultante conserva la actividad biológica del sLDLR. La fusión puede ser directa o por medio de un péptido conector corto que puede ser tan corto como el que tiene una longitud de 1 a 3 restos de aminoácido o más, por ejemplo, una longitud de 13 restos de aminoácido. Dicho conector puede ser, por ejemplo, un tripéptido de secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met), o una secuencia conectora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met introducida entre la secuencia de sLDLR y la secuencia inmunoglobulínica. La proteína de fusión resultante presenta propiedades mejoradas, tal como un tiempo de permanencia en fluidos corporales (semivida) prolongado, una actividad específica aumentada o un nivel de expresión aumentado, o su purificación se ve facilitada.

En una realización preferida, se fusiona el sLDLR con la región constante de una molécula de Ig. Preferiblemente, se fusiona con regiones de cadena pesada, tales como, por ejemplo, los dominios CH2 y CH3 de IgG1 humana. La generación de proteínas de fusión específicas que comprenden sLDLR y una porción de una inmunoglobulina se describe, por ejemplo, en el ejemplo 11 del Documento WP99/09063. Otras isoformas de moléculas de Ig son también adecuadas para la generación de proteínas de fusión de acuerdo con la presente invención, tales como isoformas IgG₂ o IgG₄, u otras clases de Ig como, por ejemplo, IgM o IgA. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multímeras, heteromultímeras u homomultímeras.

En una realización preferida de la presente invención, se utiliza el sLDLR en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 10 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal. En aún otra realización preferida, el sLDLR se usa en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 1000 µg/kg de peso corporal, o de 1 a 100 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal.

La invención se refiere además al uso de un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación de un sLDLR, en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de una infección hepática. De este modo, se utiliza una estrategia génica terapéutica para tratar y/o prevenir la enfermedad. Ventajosamente, la expresión del sLDLR será entonces *in situ*.

La invención se refiere además al uso de una célula que ha sido genéticamente modificada para que produzca un sLDLR, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de infección hepática, artritis o enfermedad inflamatoria intestinal.

Con la definición de "farmacéuticamente aceptable" se quiere abarcar cualquier vehículo que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no es tóxico para el huésped al cual se administra. Por ejemplo, para administración parenteral, la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular en una forma de dosificación unitaria para inyección, en vehículos tales como disolución salina, disolución de dextrosa, albúmina sérica y disolución de Ringer.

Los ingredientes activos de la composición farmacéutica descrita en esta memoria se pueden administrar a un individuo de diversas maneras. Las vías de administración incluyen las vías intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, epidural, tópica e intranasal. Se puede utilizar cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, tal como, por ejemplo, absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales o mediante una terapia génica con la cual se administra al paciente (por ejemplo, por medio de un vector) una molécula de DNA que codifica el agente activo, lo que causa que el agente activo sea expresado y secretado *in vivo*. Además, la(s) proteína(s) usada(s) en la invención se puede(n) administrar junto con otros componentes de agentes biológicamente activos, tales como agentes tensioactivos, excipientes, agentes diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 Para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), la(s) proteína(s) activa(s) se puede(n) formular como una disolución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado, en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, disolución salina o disolución de dextrosa) y aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y tampones). La formulación es esterilizada mediante técnicas comúnmente empleadas.

La biodisponibilidad de la(s) proteína(s) activa(s) de acuerdo con la invención puede ser también mejorada utilizando procedimientos de conjugación que aumenten la semivida de la molécula en el cuerpo humano, tal como, por ejemplo, enlazando la molécula con polietilenglicol, como se describe en la Solicitud de Patente PCT WO 92/13095.

10 Las cantidades terapéuticamente eficaces de las proteína(s) activa(s) serán una función de muchas variables, incluyendo el tipo de antagonista, la afinidad del antagonista para IL-18, cualquier actividad citotóxica residual mostrada por los antagonistas, la vía de administración y el estado clínico del paciente (incluyendo la conveniencia de mantener un nivel atóxico de actividad IL-18 endógena).

15 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es aquella que, cuando se administra, da lugar a la inhibición del virus HBV por el sLDLR. La dosis administrada a un individuo, en forma de dosis individuales o múltiples, variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas del sLDLR, la vía de administración, las condiciones y características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud y tamaño), el grado de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de IL-18 en un individuo.

20 De acuerdo con la invención, se utiliza el sLDLR en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 10 mg/kg o de aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal. Otras cantidades preferidas de los sLDLRs son cantidades de aproximadamente 0,1 a 1000 µg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 1 a 100 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal.

La vía de administración que se prefiere es la administración por vía subcutánea. Se prefiere además la administración intramuscular.

En otras realizaciones preferidas, el sLDLR se administra diariamente o en días alternos.

30 Las dosis diarias se administran normalmente en dosis divididas o en una forma de liberación continua eficaz para obtener los resultados deseados. Las administraciones segundas o subsiguientes se pueden llevar a cabo con una dosis que sea igual, menor o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo. Se puede administrar una administración segunda o subsiguiente durante, o antes de, el inicio de la enfermedad.

35 De acuerdo con la invención, el sLDLR se puede administrar profiláctica o terapéuticamente a un individuo antes de, o simultánea o secuencialmente con, otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes con múltiples fármacos), en una cantidad terapéuticamente eficaz, según es determinada por el médico de acuerdo con la eficacia del régimen. Los agentes activos que se administran simultáneamente con otros agentes terapéuticos se pueden administrar en las mismas composiciones o en composiciones diferentes.

Una vez descrita la invención, será más fácilmente entendida por referencia a los ejemplos siguientes, que se proporcionan a modo de ilustración.

40 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de sLDLR

1.1. Multiplicación de fragmentos de hsLDLR por PCR

45 Se aislaron los genes de LDLR de fragmentos +292 y +331 mediante multiplicación por PCR usando como molde el gen de LDLR completo. La multiplicación se llevó a cabo en mezclas de reacción que contenían 1 ng del molde, 400 ng de cada cebador (véase la sección 6.1), mezcla de dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM y 5 U de DNA polimerasa Pfu (Stratagene) en el tampón suministrado con la enzima, en un volumen total de reacción de 100 µl. Se emplearon 31 ciclos térmicos (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 65 °C y 2 minutos a 72 °C), precedidos de un calentamiento de 2 minutos a 94 °C y seguidos de 10 minutos a 72 °C.

1.2. Preparación de DNA plasmídico

50 Se preparó DNA plasmídico usando un kit comercialmente asequible (Qiagen DNA Maxi Kit, nº de catálogo: 12162), de acuerdo con el procedimiento descrito por el fabricante.

1.3. Transfección y multiplicación génica

Se cultivaron células CHO-DUKX (deficientes en cuanto a actividad DHFR) en medio F12 complementado con FBS al 10%. La transfección se llevó a cabo mediante liposomas catiónicos empleando LipofectAmine (Gibco BRL), de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. Setenta y dos horas después de la transfección, las células fueron transferidas a un medio selectivo. Las células que expresaban la actividad DHFR formaban colonias, que fueron aisladas levantando las células con discos de papel empapados en tripsina y exploradas en cuanto a actividad r-hsLDLR

La multiplicación génica se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento siguiente:

Los clones que habían crecido en el medio selectivo (actividad DHFR positiva) fueron sembrados con una densidad baja (4000 células/cm²) en 5-6 matraces en T, cada uno de los cuales contenía metotrexato (MTX) en concentraciones crecientes que variaban de 0 (como un testigo) a 100 nM.

1. Aproximadamente 10 días después de la exposición a MTX, se pudieron visualizar microscópicamente las colonias resistentes en parte de los matraces en T. Los cultivos que presentaban una supervivencia celular de aproximadamente 10% fueron escogidos para la siguiente operación de multiplicación.
2. Las células fueron sembradas con una densidad baja (4000 células/cm²) en 5-6 matraces en T, cada uno de los cuales contenía metotrexato en una concentración diferente. Las células fueron sembradas en MTX en concentraciones crecientes que variaban de la concentración escogida en la operación 1 (concentración más pequeña) a 10 veces la concentración escogida (concentración más grande).
3. Se repitieron las operaciones 1 – 2 en los siguientes ciclos de multiplicación.
4. Después del último ciclo de multiplicación génica, las células fueron subclonadas por dilución limitante.
5. Se obtuvo el r-hsLDLR de las células mediante métodos convencionales.

1.4. Bioensayo

Se empleó un bioensayo semicuantitativo para controlar el producto por todas las fases de desarrollo. El ensayo era un ensayo de inhibición de CPE, similar al bioensayo usado para IFN-β. En las fases iniciales del desarrollo, se utilizó IFN-β como patrón. Más adelante fue sustituido por una partida de r-hsLDLR purificado.

Se cultivaron células WISH en medio MEM 1x complementado con FBS al 10% y glutamina 4 mM, en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5%. Veinticuatro horas antes del ensayo, células que crecían exponencialmente fueron sembradas en placas TC de 96 pocillos, con una densidad de 40.000 células/pocillo. Las muestras que se iban a examinar y el patrón fueron diluidos y distribuidos en los pocillos que contenían células. Se añadió inmediatamente VSV a los pocillos, con una MOI de 0,5 pfu/célula. Las placas fueron incubadas durante 16-18 horas a 37 °C y fueron luego lavadas con etanol. Se observó la monocapa de células supervivientes mediante el colorante violeta cristal Gram. La cuantificación del efecto citopático con respecto al patrón se llevó a cabo trazando gráficamente la densidad cromática frente a la concentración de patrón.

Ejemplo 2: Inhibición de la liberación de HBV por células de hepatoma víricamente infectadas

Se examinó la capacidad de sLDLR para inhibir virus patógenos mediante el programa "Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility" (AACF) del "National Institute of Allergy and Infectious Diseases" (NIAID). Cultivos confluentes de células 2.2.15 [células de carcinoma hepatocelular HepG2 humano (ATCC HB-8065) infectadas con HBV, que desprenden constitutivamente viriones HBV] fueron mantenidos en medio RPMI 1640 con suero bovino fetal al 2% (Korba y Gerin, Antivir. Res. 19: 55-70, 1992), en placas de fondo plano y 96 pocillos para cultivo tisular. Los cultivos (6 para cada una de las 4 concentraciones de ensayo en dos placas duplicadas) se trataron con nueve dosis diarias consecutivas de compuestos sLDL. Se cambió diariamente el medio con compuestos de ensayo frescos. 24 horas después del último tratamiento, se evaluó el DNA de virión HBV en el medio de cultivo mediante hibridación cuantitativa por transferencia. Se utilizó la incorporación de colorante rojo neutro (absorbancia del colorante internalizado a 510 nm [A510]) para determinar el nivel relativo de toxicidad 24 horas después del último tratamiento (Korba y Gerin, Antivir. Res. 19: 55-70, 1992). Los valores se presentan como un porcentaje de los valores medios de A510 para 9 cultivos separados de células no tratadas y mantenidas en la misma placa. Para los análisis de toxicidad se sembraron cultivos al mismo tiempo con la misma colección de células de reserva utilizada para los análisis antiviricos y mantenida de una manera idéntica. Se trató un total de 3 cultivos con cada concentración de compuesto de ensayo. En los análisis de toxicidad se utilizaron niveles 10 veces mayores de los compuestos de ensayo (con diluciones sucesivas al triple). Se calcularon los valores de CC50, EC50, EC90 y S.I. (CC50/EC90). Como testigo de ensayo positivo se utilizó lamivudina (3TC). Se obtuvieron los resultados siguientes:

ES 2 400 743 T3

sLDLR, µg/ml				Lamivudina, µM			
CC50	EC50	EC90	SI	CC50	EC50	EC90	SI
> 10	0,131	0,922	> 11	2308	0,045	0,146	15.178

De este modo, el sLDLR inhibía la formación del virión HBV a partir de células víricamente infectadas, en concentraciones muy por debajo de la toxicidad.

5 Ensayos adicionales llevados a cabo con sLDLR mostraron que era activo frente a todos los mutantes resistentes a lamivudina y también a adefovir dipivoxil examinados, como se muestra en la tabla siguiente.

n° de ARB	Nombre del compuesto	Virus	Tipo de ensayo	Cepa	Unidades del fármaco	EC		Testigo: 3TC (µM)		Testigo: ADV (µM)	
						EC50	EC90	EC50	EC90	EC50	EC90
07-000023	MRAWBA	HBV	HBVDR	WT	µM	0,9	6	0,2	0,7	1,5	6,5
		HBV	HBVDR	L180M	µM	0,8	6,3	5,2	20	1,9	8,5
		HBV	HBVDR	M204V	µM	1	6,5	> 100	> 100	1,8	7
		HBV	HBVDR	M2041	µM	1,1	8	> 100	> 100	1,3	7,2
		HBV	HBVDR	LM/MV	µM	1,2	7,5	> 100	> 100	1,3	7,8
		HBV	HBVDR	N236T	µM	1	8,2	0,2	0,6	8,1	32

Referencias

- Agnello et al. (1999), PNAS, 96: 12.766-12.771
- Fischer et al. (1993), Science, volumen 262, 250-253
- 10 Goldstein et al. (1979), Nature 279, 679-685
- Yamamoto et al. (1984), Cell, volumen 39, 27-38

REIVINDICACIONES

1. Uso de un sLDLR (receptor soluble de LDL) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una infección del hígado.
2. El uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la infección del hígado es vírica, aguda o crónica.
- 5 3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sLDLR es sLDLR o una isoforma del mismo, o una proteína fusionada del mismo, o un derivado funcional seleccionado de entre sLDLR con cadenas laterales de polietilenglicol, ésteres alifáticos de los grupos carboxilo, amidas de los grupos carboxilo por reacción con amoníaco o con aminos primarias o secundarias, derivados N-acílicos de grupos amino libres de los restos de aminoácido, formados con componentes acílicos, o derivados O-acílicos de grupos hidroxilo libres, formados con componentes acílicos.
- 10 4. El uso de acuerdo con la Reivindicación 3, en donde el sLDLR está PEGilado.
5. El uso de acuerdo con la Reivindicación 3, en donde el sLDLR es una proteína fusionada y comprende todo, o parte de, un sLDLR fusionado con toda, o parte de, una inmunoglobulina.
- 15 6. El uso de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde la proteína fusionada comprende toda, o parte de, la región constante de una inmunoglobulina.
7. El uso de acuerdo con la Reivindicación 6, en donde la inmunoglobulina es del isotipo IgG1 o IgG2.
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sLDLR se utiliza en una cantidad de aproximadamente 0,0001 a 10 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 a 3 mg/kg de peso corporal o de aproximadamente 1 a 2 mg/kg de peso corporal.
- 20 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sLDLR se usa en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 1000 µg/kg de peso corporal, o de 1 a 100 µg/kg de peso corporal o de aproximadamente 10 a 50 µg/kg de peso corporal.
- 25 10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sLDLR se administra subcutánea o intramuscularmente.
11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sLDLR se administra diariamente o en días alternos.
12. Uso de un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación de un sLDLR, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una infección del hígado.
- 30 13. El uso de acuerdo con la Reivindicación 12, para terapia génica.
14. Uso de un vector para inducir y/o potenciar la producción endógena de un sLDLR en una célula, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una infección del hígado.
15. Uso de una célula que ha sido genéticamente modificada para que produzca un sLDLR, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una infección del hígado.