

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 729**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007** **E 07712377 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014** **EP 1993585**

54 Título: **Uso de la pentraxina larga PTX3 para la prevención o el tratamiento de enfermedades virales**

30 Prioridad:

10.03.2006 EP 06004971

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

11.07.2014

73 Titular/es:

**SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.P.A. (100.0%)
Viale Shakespeare, 47
00144 Rome, IT**

72 Inventor/es:

**CARMINATI, PAOLO;
SASSANO, MARICA;
BISTONI, FRANCESCO;
ROMANI, LUIGINA y
BOZZA, SILVIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 475 729 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

Uso de la pentraxina larga PTX3 para la prevención o el tratamiento de enfermedades virales

5 La invención descrita en esta memoria se refiere al uso de pentraxina larga PTX3 (PTX3) o uno de sus derivados funcionales, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades virales y/o para inhibición de la activación de virus, en el cual dicho virus se selecciona del grupo constituido por herpesvirus, tal como citomegalovirus (CMV); virus de la influenza, tales como virus H1N1, H3N2, H5N1 o H5N7; paramixovirus, tal como el sarampión, virus respiratorio sincitial; coronavirus, tal como SARS; virus HIV; virus de la hepatitis; o rotavirus.

10 El citomegalovirus humano (HCMV) es un herpesvirus encontrado comúnmente en aproximadamente 50% de la población general. Aproximadamente 90% de las personas con HIV son soportes de HCMV. En la población general, el virus se mantiene usualmente latente en los tejidos del cuerpo después de la infección inicial. Sin embargo, el mismo puede difundirse en la boca, orina, y tracto genital, sirviendo como fuente de infección para otras personas. La infección con HCMV puede dar como resultado infecciones secundarias más graves si el sistema inmunitario llega a verse comprometido por cualquier razón.

15 Aproximadamente el 5% de los niños que adquieren HCMV por transmisión vertical tienen defectos de nacimiento graves. Éstos pueden incluir daño cerebral, fallo del crecimiento, ceguera, y otros defectos. Este problema se presenta usualmente cuando la madre llega a infectarse con HCMV por primera vez durante el embarazo.

20 En la población adulta general, HCMV se mantiene durmiente, pero puede asociarse con el desarrollo de enfermedad de las arterias coronarias. La infección por HCMV ha sido asociada con el desarrollo de placas arteriales y aterosclerosis.

HCMV puede causar problemas graves en las personas con sistemas inmunitarios debilitados.

25 Esto es con gran frecuencia un problema en personas con SIDA o en aquellos pacientes sometidos a terapia inmunosupresora. HCMV infecta entre el 75 y el 100% de pacientes HIV-positivos. Las complicaciones más comunes asociadas con HCMV incluyen coriorretinitis; infecciones del tracto gastrointestinal, con inclusión de hepatitis, esofagitis, colitis, gastritis, y pancreatitis; implicaciones neurológicas, que incluyen encefalitis y polirradiculitis; implicación pulmonar, y epididimitis.

30 Las personas con cáncer extendido o personas que reciben trasplantes de órganos o de médula ósea se ven afectadas comúnmente. La infección puede ser debida a una exposición por primera vez a HCMV o como resultado de HCMV reactivado. En los pacientes de trasplantes y de cáncer, HCMV causa usualmente neumonía o una infección gastrointestinal que da como resultado diarrea, la cual puede causar la muerte. Adicionalmente, HCMV contribuye al desarrollo de disfunción crónica de aloinjertos en los receptores de trasplantes de órganos sólidos. La relación entre la enfermedad HCMV y el desarrollo de bronquitis obliterante en los receptores de trasplantes de pulmón está bien establecida. Adicionalmente, HCMV es uno de cierto número de factores de riesgo que pueden conducir a lesión del aloinjerto. La invasión viral directa del aloinjerto puede causar hepatitis por HCMV en los pacientes de trasplante de hígado o riñón. Además de los síndromes directos producidos por HCMV, la infección con este virus puede aumentar el riesgo de infecciones fúngicas y otras infecciones oportunistas, tales como neumonía por *Pneumocystis carinii* y la enfermedad linfoproliferativa posterior a trasplante relacionada con el virus Epstein-Barr.

40 La mayoría de las personas han sido infectadas con HCMV cuando las mismas alcanzan la edad adulta. Cualquier persona que reciba una transfusión de sangre o un trasplante de órganos corre el riesgo de infección de HCMV.

Adicionalmente, las personas con sistemas inmunes debilitados y niños no nacidos se encuentran en riesgo de enfermedad grave.

El tratamiento de HCMV activo en las personas con sistemas inmunes debilitados se realiza actualmente con agentes antivirales, tales como ganciclovir, foscarnet, y cidofovir.

45 El virus de la influenza causa gripe, una enfermedad contagiosa que infecta el tracto respiratorio (nariz, garganta y pulmones) en los humanos. La influenza aparece usualmente de manera repentina y puede incluir estos síntomas: fiebre, dolor de cabeza, malestar (una sensación de estar enfermo y sin energía que puede ser extrema), tos, dolor de garganta, congestión nasal y dolencias corporales. Los virus Paramixoviridae inducen una gran diversidad de enfermedades clínicas distintas en los humanos, las cuales incluyen virus del sarampión, virus de las paperas, que tiene síntomas de parotiditis, orquitis y encefalitis; y los virus de la parainfluenza que son patógenos respiratorios.

55 El virus respiratorio sincitial (RSV) es la causa más común de bronquiolitis y neumonía entre los bebés y niños inferiores a la edad de 1 año. Enfermedad: comienza muy frecuentemente con fiebre, nariz moqueante, tos, y a veces respiración sibilante. El RSV causa también infecciones repetidas a lo largo de la vida, asociadas usualmente con síntomas de tipo resfriado moderados a graves; sin embargo, la enfermedad grave del tracto respiratorio inferior

puede presentarse a cualquier edad, especialmente entre los ancianos o entre aquéllos con sistemas cardiaco, pulmonar, o inmunitario comprometidos.

5 Los coronavirus infectan una diversidad de mamíferos y aves, en los humanos causan infecciones respiratorias que incluyen el Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS), infecciones entéricas y síndromes neurológicos. Las infecciones de los adultos son menos comunes y parece que ocurren re-infecciones a lo largo de la vida.

10 El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) es un retrovirus. La información genética en una partícula de retrovirus está codificada por RNA. Después de la entrada en la célula hospedadora, este RNA es copiado en DNA por la enzima transcriptasa inversa del virus. Esta copia de cDNA de la información genética del virus puede integrarse en los cromosomas de las células del hospedador en el núcleo. Este postvirus puede mantenerse durmiente durante muchas divisiones celulares antes de ser reactivado y producir partículas de retrovirus más infecciosas.

15 La hepatitis viral es cualquier tipo de inflamación hepática causada por una infección viral. Los tres virus más comunes reconocidos actualmente que causan enfermedad hepática son hepatitis A, hepatitis B, y hepatitis no-A, no-B (denominada también hepatitis C). Varios otros tipos han sido reconocidos (hepatitis D, hepatitis E, y la recientemente identificada hepatitis G). Se sospecha un séptimo tipo (hepatitis F), pero no ha sido confirmado todavía.

El rotavirus es la causa más común de diarrea grave entre los niños, dando como resultado la hospitalización de aproximadamente 55.000 niños cada año en los Estados Unidos y la muerte de más de 600.000 niños anualmente en todo el mundo.

20 PTX3 es una proteína expresada en diversos tipos de células (Bottazzi, et al., J. Biol. Chem., 1997; 272; 32817-32823), particularmente en fagocitos mononucleares y células endoteliales después de exposición a las citocinas inflamatorias interleucina I beta (IL-I-beta) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-alfa).

25 Esta proteína consiste en dos dominios estructurales, un terminal N no relacionado con ninguna molécula conocida, y un terminal C similar a las pentraxinas cortas tales como la proteína C-reactiva (CRP). Se ha encontrado una semejanza sustancial entre PTX3 humana (hPTX3) y PTX3s animales.

El gen PTX3 está localizado en el cromosoma 3 del ratón, en una región similar a la región 3q humana (q24-28), de acuerdo con la localización documentada de hPTX3 en la región 3q 25. Además, PTX3 de ratón (mPTX3) (Introna, M., et al.: Blood, 87 (1996); 1862-1872) es muy similar a hPTX3 sobre la base de organización, localización y secuencia (Breviario, F., et al.: J- Biol. Chem., 267, 22190, 1992).

30 En particular, el grado de identidad entre las secuencias es 82% entre el gen humano y el gen de ratón, y alcanza 92% si se consideran sustituciones conservadoras.

El alto grado de semejanza entre la secuencia de hPTX3 y la de mPTX3 es una señal del alto grado de conservación de pentraxina en el curso de la evolución (Adv. Immunol. 34:141, 1983).

Para una revisión de las pentraxinas, véase H. Gewurz, et al., Current Opinion in Immunology, 1995, 7. 54-64.

35 Usos previos de PTX3 son ya conocidos.

La solicitud de patente internacional WO 99/32516 (que es la técnica anterior más próxima) presentada en nombre del actual solicitante, describe el uso de pentraxina larga PTX3 para la terapia de enfermedades infecciosas (hongos, bacterias, protozoos o virus), inflamatorias o tumorales. En WO 99/32516 no se menciona nunca que PTX3 hubiera sido útil en ningún caso para tratamiento de HCMV o virus de la influenza.

40 WO 02/38169 describe el uso de pentraxina larga PTX3 para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de enfermedades asociadas con la activación anormal del factor de crecimiento FGF-2.

WO 02/36151 describe el uso de pentraxina larga PTX3 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

WO 03/011326 describe el uso de pentraxina larga PTX3 para el tratamiento de la infertilidad femenina.

45 WO 03/084561 describe el uso de pentraxina larga PTX3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades tumorales asociadas con la activación anormal del factor de crecimiento FGF-8.

WO 03072603 describe el uso de la pentraxina larga PTX3 para preparación de una vacuna autóloga para el tratamiento de tumores.

50 WO 2005060988 describe el uso de la pentraxina PTX3 y de su combinación con TSG-6 para preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades óseas o cartilagosas y para el tratamiento de la infertilidad femenina.

WO 2005060997 describe el uso de inhibidores de la pentraxina larga PTX3 para la preparación de un medicamento para la prevención y el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de enfermedades degenerativas de hueso y cartílago.

5 WO 2005107791 describe la combinación de pentraxina PTX3 con antifúngicos para el tratamiento de infecciones fúngicas y particularmente para infecciones causadas por *Aspergillus fumigatus*.

Blood, 1 de enero 2006, volumen 107, número 1, describe que PTX3 contribuye a limitar el deterioro tisular en condiciones inflamatorias y las activaciones de células autorreactivas.

10 Sorprendentemente y de modo inesperado, se ha encontrado ahora que la pentraxina larga PTX3 es útil para la preparación de un medicamento para la inhibición de la activación de virus y/o para la prevención o tratamiento de enfermedades virales.

15 Es por tanto un objeto de la presente invención el uso de una cantidad eficaz de la pentraxina larga PTX3, para preparar un medicamento para la inhibición de la activación de enfermedades virales seleccionadas del grupo que comprende herpesvirus, tal como citomegalovirus (CMV); virus de la influenza, tales como virus H1N1, H3N2, H5N1 o H5N7; paramixovirus, tal como el sarampión, virus respiratorio sincitial; coronavirus, tal como SARS; virus HIV; virus de la hepatitis; o enfermedad por rotavirus, en un individuo mamífero.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de una cantidad eficaz de la pentraxina larga PTX3 para preparación de un medicamento para inhibición de la activación de virus en un síndrome inducido por citomegalovirus, en el cual:

- dicho síndrome es mononucleosis por CMV;
- 20 • dicho síndrome está asociado con un hospedador inmunodeficiente;
- dicho hospedador inmunodeficiente padece SIDA;
- dicho hospedador inmunodeficiente es un receptor de trasplantes de órganos.

25 Un objeto adicional de la presente invención es el uso de una cantidad eficaz de la pentraxina larga PTX3 para preparación de un medicamento para inhibición de la activación viral para el síndrome inducido por influenza, en el cual dicho síndrome es debido a un virus seleccionado del grupo constituido por el virus H1N1, H3N2, H5N1 o H5N7.

Los ejemplos siguientes, no limitantes, ilustran la invención.

Materiales y Métodos

Abreviaturas utilizadas:

30 HCMV: CMV humano; MCMV: CMV murino; DC: célula dendrítica; gB: glicoproteína B; pDC: DC plasmacitoide; PTX3: pentraxina 3.

Ratones

35 Ratones hembra endogámicos de tipo salvaje (WT) de 8 a 12 semanas C57BL6, 129/Sv y BALB/c se adquirieron de Charles River Breeding Laboratories (Calco, Italia). Pares endogámicos de ratones homocigóticos deficientes en TLR9-(TLR9^{-/-}), TLR4-(TLR4^{-/-}), TLR2-(TLR2^{-/-}), MyD88-(MyD88^{-/-}) y IL-12 p40 (IL-12p40^{-/-}) (todos ellos de base C57BL6), y ratones deficientes en IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}) (de base BALB/c), (Science 2003, 301:640) (Nature Immunol. 2001, 2:1144) (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004, 101:3516) (Immunity 2004, 21:107) (J. Exp. Med. 2002, 195:517). Ratones deficientes en PTX3 (PTX3^{-/-}) (generados sobre base mixta 129/Sv-C57BL6) (Nature 2002, 420:182). Se utilizaron ratones deficientes para el receptor IFN- $\alpha\beta$ (IFN- $\alpha\beta$ -R^{-/-}) (J. Exp. Med. 2003, 197:885).

Patógenos, infecciones y tratamientos

Se prepararon stocks de extractos de glándula salivar de MCMV de la cepa Smith a partir de ratones BALB/c y se titularon en un ensayo estándar en placas en células fibroblastos de embrión murino (MEF) BALB/c (J. Gen. Virol. 2002, 83:2983).

45 La cepa A/Sidney/5/97 del virus de la influenza (H3N2) se cultivó en huevos embrionados y se tituló en un ensayo estándar en placas sobre Madin Darby Canine Kidney (MDCK) (Virology 2005, 340: 296).

50 Las infecciones se iniciaron por inyección intraperitoneal de 10⁵ (BALB/c), 5 x 10⁵ (C57BL6, PTX3^{+/+} y PTX3^{-/-}) unidades formadoras de placas (PFU) de MCMV. Los tejidos separados se homogeneizaron individualmente, los sobrenadantes se guardaron a -80°C, y los títulos de virus se cuantificaron subsiguientemente en MEF por ensayo estándar en placas. Se obtuvo PTX3 en condiciones exentas de endotoxina por inmunoafinidad de los sobrenadantes de cultivo de células CHO transfectadas con PTX3 (Nature 2002, 420:182) y se administró

5 intraperitonealmente (1 ó 4 mg/kg) durante 7 ó 14 días comenzando el día de la infección. Se administró Ganciclovir (GCV) (Cymevene; de Recordati, Milán, Italia) a 40 mg/kg por vía intraperitoneal, 3 veces por semana, comenzando 6 horas después de la infección. Los controles recibieron el diluyente solo. Para histología, se tiñeron secciones de tejidos incrustados en parafina con el procedimiento de ácido peryódico-Schiff. La cepa de *A. fumigatus* y las condiciones de cultivo fueron como se ha descrito (Blood 2003, 102:3807).

Para co-infección, ratones infectados con MCMV recibieron 5×10^5 conidios de *Aspergillus* por vía intravenosa, dos semanas después de la infección viral y tratamiento subsiguiente con PTX3 (1 mg/kg/intraperitoneal) diariamente durante una semana. La cuantificación del crecimiento fúngico se realizó por ensayo de quitina y los resultados se expresan como microgramos de glucosamina/órgano (Blood 2003, 102:3807).

10 Modelo experimental HSCT

Los ratones receptores se expusieron a una dosis letal de 8 Gy y se infundieron con 10^7 /ml de células donantes empobrecidas en células T (< 1% de células T contaminantes) procedentes de ratones donantes alogénicos, como se ha descrito (Blood 2003, 102: 3807).

Reactivación de MCMV después del HSCT

15 Se infectaron los ratones con MCMV como anteriormente. Tres meses después, se confirmó la latencia de MCMV por la ausencia de infección aguda de MCMV en el bazo (J Immunol 2005, 174:1587) y pulmón (J Virol 1997, 71:2980), considerados ambos órganos como sitios primarios de latencia molecular de MCMV. Los ratones infectados se utilizaron como receptores de células de médula ósea no infectadas de donantes alogénicos (receptores MCMV⁺) o como donantes de células de médula ósea (donantes MCMV⁺) a inyectar en receptores no infectados. Se administró PTX3 (1 mg/kg/intraperitonealmente) durante 2 semanas, comenzando el día después del HSCT. Los ratones moribundos o supervivientes (sacrificados 30 días después de HSCT se evaluaron respecto a cargas virales de MCMV en los pulmones por ensayo de placas.

Generación del subgrupo DC

25 Se obtuvieron DC murinas a partir de células de médula ósea cultivadas en medio modificado de Iscove (Blood 2003, 102:3807) en presencia de 150 U/ml de rGM-CSF de ratón (Sigma) y 75 U/ml de rIL-4 (R&D Systems) durante 7 días para obtener CD11⁺DC o 200 ng/mL de FLT3-L (Immunex Corporation, Seattle, WA) durante 9 días para obtener pDC (Blood 2003, 102:3807). La maduración final se realizó como se ha descrito en Blood 2003, 102:3807, se discriminaron CD11⁺DC en cuanto a la expresión de CD11c^{high} y estaban compuestos claramente de CD8 α ⁺ DC and CD11b⁺ DC. pDC se definieron como células CD11c^{low}, Ly6G⁺ CD8 α +/- . Se purificaron DC de bazo por clasificación activada magnéticamente, utilizando CD11c MicroCuentas y MidiMacs (Miltenyi Biotec). Se tomaron fotografías utilizando una Cámara AxioCam, Resolution Microscopy Colour con empleo de Software AxioVision Rel. 3.1 (Carl Zeiss S.p.A., Milán, Italia).

Análisis por citometría de flujo

35 Para todos los análisis FACS, se incubaron en primer lugar las células con anti-CD16/32 (2.4G2) a fin de asegurar el bloqueo de FcRs y se analizaron respecto a expresión de antígeno con un citofluorómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) equipado con software CELLQuest™. Se utilizó tinción de control de las células con Ab irrelevante a fin de obtener valores de fluorescencia de fondo. Los Abs eran de BD Pharmingen. Los datos obtenidos se evaluaron como porcentaje de células positivas. Los histogramas son representativos de uno de cada cuatro experimentos independientes.

40 Ensayo en placas

El ensayo en placas se determinó sobre células que se dejaron crecer hasta sub-confluencia y se incubaron con muestras de virus diluidas en serie durante 2 horas a 37°C (Science 2001, 292:934).

Todos los órganos procedentes de animales no infectados eran negativos respecto a virus. Los títulos de virus se expresan como Log₁₀ (valor medio \pm errores estándar, SE).

45 Ensayos de fijación de PTX3 a virus inmovilizados

50 Las placas de 96 pocillos se recubrieron durante una noche a 4°C con una solución de carbonato 0,05 M (0,159 g de Na₂CO₃ y 0,293 g de NaHCO₃, pH 9,8) (Sigma) que contenía las 10⁴ PFU de MCMV o virus H3N2 de la influenza humana. Los sitios de fijación inespecífica se bloquearon con seroalbúmina bovina al 5% en PBS. La fijación de PTX3 a HCMV se midió utilizando placas de HCMV recubiertas con Ag (AID GmbH, Alemania). La fijación se realizó utilizando 0,5, 1 ó 5 μ g/mL de PTX3 marcada con biotina (PTX3bio⁺) durante 2 horas a 37°C. La inhibición se realizó por preincubación con 0,5 ó 5 μ g/mL de PTX3 no biotinilada (PTX3bio⁻) durante 2 horas a 37°C antes de la adición de PTX3bio⁺. Se leyó la densidad óptica a 450 nm utilizando el Kit Sustrato de Peroxidasa de Rábano Picante (Bio-Rad Laboratories, Life Science Group, Segrate Italia). La fijación inespecífica de PTX3 a las placas no recubiertas con virus era mínima.

Inhibición de la replicación viral

5 Células MEF (2 x 10⁴/pocillo) dejadas crecer hasta subconfluencia se preincubaron durante 2 horas a 37°C con 5-0,5 µg/ml de PTX3 diluida en DMEM exento de suero y se les añadieron luego 10⁴ PFU de MCMV o se dejaron sin tratar y se infectaron con 10⁴ PFU de MCMV pretratados con 5-0,5 µg/ml de PTX3 durante 2 horas a 37°C. En experimentos seleccionados, se utilizó un anticuerpo monoclonal neutralizante de PTX3 (70 ng/100 µl) (Clin. Exp. Immunol. 2000, 119:196) para minimizar los efectos de arrastre. La infectividad se midió después de 72 horas de incubación a 37°C, como se indica por experimentos iniciales. Se infectó falsamente un pocillo por placa y sirvió como control de células. En el caso de DC, se preincubaron 10⁶ células/pocillo durante 2 horas a 37°C con 5 µg/ml de PTX3 diluido en DMEM exento de suero y se les añadieron luego 10⁵ PFU de MCMV o se dejaron sin tratar y se infectaron con 10⁵ PFU de MCMV pretratados con 5 µg/ml de PTX3 durante 2 horas a 37°C. Las células se ensayaron respecto a infectividad después de 48 horas de incubación. Para la inhibición de la replicación de H3N2, se expusieron 3 x 10⁴ viriones a 5-0,5 µg/ml de PTX3 durante 2 horas a 37°C antes de la adición de células MDCK confluentes. La infectividad se evaluó en días diferentes después de la infección por ensayo en placas.

Actividad citotóxica de las células NK

15 Las células NK, purificadas a partir de bazos por microcuentas DX5 (Miltenyi Biotec), se definieron como células NK1.1⁺CD3⁻. La actividad citolítica de NK se evaluó contra células de linfoma YAC-1 marcadas con ⁵¹Cr (Blood 2005, 106:4397).

RT-PCR en tiempo real para cuantificación de mRNA de MCMV

20 Se utilizó un ensayo RT-PCR de alta sensibilidad para amplificación del segmento de 356 pb del DNA de la glicoproteína B (MCMV) (gB) (Virus Res 2003, 98:117).

Se obtuvo RNA celular total por extracción con TRIzol después de la disrupción de las células en nitrógeno líquido (Invitrogen Life Technologies, Milán, Italia). Se realizaron la síntesis y PCR del cDNA como se ha descrito (Blood 2003, 102:3807). Se seleccionaron iniciadores oligonucleotídicos de DNA sintético a partir de la secuencia publicada del gen gB de MCMV (J. Immunol. 2005, 175:6723).

25 Los cebadores sentido estaban basados en el cDNA No. 2416-2443: 5'-AAG-CAG-CAC-ATC-CGC-ACC-CTG-AGC-GCC-3', y los antisentido en No. 2745-2772: 5'-CCA-GGC-GCT-CCC-GGC-GGC-CCG-CTC-TCG-3'. Para verificar la presencia de DNA en cada experimento, se realizó una amplificación paralela con actina utilizando los oligonucleótidos siguientes: 5'-GAG-ACC-TTC-AAC-ACC-CCA-GCC (sentido) y 5'-GGC-CAT-CTC-TTG-CTC-GAA-GTC (antisentido). La PCR se realizó en un ciclo térmico (gradiente MasterCycler; Eppendorf), siendo las condiciones de ciclación desnaturalización inicial durante 3 minutos a 95°C, seguida por ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, y 20 s a 72°C, y una extensión final durante 10 minutos a 72°C.

Cuantificación de citocinas por ensayos ELISA y ELISPOT

35 Los niveles de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo estimuladas por mitógenos (estimulación durante 48 horas con 10 µg/ml de ConA) o DC pulsadas con MCMV (24 horas) se determinaron por ELISA (R&D Systems y PBL, Biomedical Lab, Milán, Italia). Los límites de detección (pg/ml) de los ensayos eran < 16 para IL-12 p70, < 10 para IFN-γ, <3 para IL-10 y < 10 para IFN-α. Las células NK productoras de IFN-γ se enumeraron por el ensayo ELISPOT sobre NK purificada de bazos como ha sido descrito (Blood 2003, 102:3807). Los resultados se expresan como el número medio de células productoras de citocinas (± SE) por 10⁵ células, calculado utilizando réplicas de diluciones de células seriadas al doble.

40 Cuantificación de PTX3 por ELISA

La cuantificación de PTX3 en sueros y homogeneizados de pulmón (una semana después de la infección) se realizó por ELISA como se ha descrito (Eur. J. Immunol. 2003, 33: 2886).

Análisis estadísticos

45 Se utilizó el ensayo *t* apareado de Student para determinar la significación de los valores en grupos experimentales (la significación se definió como *P* < 0,05). Los datos de supervivencia se analizaron utilizando el test U de Mann-Whitney. Los grupos in vivo estaban constituidos por 6 animales. A no ser que se indique otra cosa, los datos son valores medios ± SE.

RESULTADOS

PTX3 inhibe la infección por CMV in vitro

50 Para testar si PTX3 afecta a la infección por CMV in vitro, se evaluó i) la capacidad de PTX3 para fijarse a HCMV o MCMV, ii) los efectos de la exposición del virus a PTX3 sobre la infección productiva en células MEF permisivas y iii) los efectos del tratamiento de las células MEF con PTX3 sobre la infección viral subsiguiente. PTX3 se fijaba tanto a

HMCV como a MCMV de una manera dependiente la dosis y la fijación se reducía significativamente en presencia de PTX3 sin marcar (Figura 1A). La fijación de PTX3 a HMCV no se inhibía en presencia de anticuerpos humanos dirigidos contra los antígenos de 150 (tardío), 55 y 52 (tempranos) o 28 kDa (específico), un hallazgo que sugería la diversidad de moléculas virales reconocidas por PTX3 y anticuerpos humanos específicos. La exposición a PTX3 inhibía fuertemente, de manera dependiente de la dosis, la infección viral, como se evaluó 72 horas más tarde por los niveles reducidos del transcrito MCMV gB en células infectadas (Figura 1A). El efecto inhibitorio era rápido y la desactivación se obtuvo ya después de 30-45 minutos de exposición. Es interesante que el pretratamiento de células con la concentración máxima de PTX3 inhibía también la infección. Dado que los experimentos en los que se neutralizaba PTX3 residual por anticuerpos específicos descartaban los posibles efectos de arrastre de PTX3 libre sobre las células o el virus, estos hallazgos sugerían que PTX3 afecta a la infectividad viral y la permisividad de las células a la infección. Para evaluar si PTX3 podría fijar análogamente otros virus envueltos, se evaluó la capacidad de PTX3 para fijar el virus de la influenza humana H3N2 e inhibir la infectividad in vitro. La Figura 1B muestra que PTX3 fijaba fuertemente el virus en una concentración y manera específica e inhibía notablemente su infectividad in vitro, como se determinaba por el efecto citopático reducido completo observado a la concentración máxima de PTX3 utilizada. PTX3 retardaba también ligeramente la infección después del pretratamiento de las células, hallazgo que confirmaba un posible efecto de PTX3 sobre la permisividad celular a la infección. En ambos tipos de células, PTX3 no tenía efecto visible alguno sobre la confluencia de la monocapa de células y/o la morfología de las células, confirmando que PTX3 es atóxico.

La infección aguda con MCMV induce una inmunosupresión transitoria pero profunda en los ratones susceptibles BALB/c, que puede estar ligada a la infección de CD11⁺DC (Nat Immunol 2001, 2:1077). CD11⁺DC soportan la infección productiva de MCMV tanto in vitro como in vivo, mientras que MCMV no se replica en pDC (J. Exp. Med. 2002, 195:517).

Para evaluar si PTX3 podría afectar también a la infección por MCMV de DC, se añadió MCMV tratado con PTX3 a CD11⁺DC y pDC de ratones BALB/c y se evaluó la efectividad como anteriormente. Se pretrataron también DC con PYX3 antes de la infección. Los resultados demostraron que MCMV se replica en CD11⁺DC, pero el tratamiento con PTX3 del virus o las células reducía notablemente la replicación viral. No pudo revelarse utilización viral alguna en pDC (Figura 1C). PTX3 reducía también la replicación viral en CD11⁺DC de los ratones C57BL6. Estos resultados sugieren que PTX3 puede prevenir la infección por MCMV por inhibición de la infectividad viral y por acortamiento de las etapas subsiguientes de la infección.

PTX protege contra la infección por CMV y la reactivación in vivo

Los resultados anteriores predecirían que PTX3 puede tener efectos antivirales in vivo. Se evaluaron los efectos de la administración de PTX3 en la infección primaria aguda de ratones susceptibles (BALB/c) o resistentes (C57BL6) así como en la reactivación en un modelo experimental de HSCT. Los ratones se infectaron intraperitonealmente con una dosis subletal de MCMV, se trataron con dosis diferentes de PTX o GCV y se determinaron las cargas de títulos en bazo, pulmón, hígado y glándulas salivares al cabo de 1, 2 y 4 semanas después de la infección por titulación según el ensayo estándar en placas (Figura 2A). En línea con informes anteriores (Virus Res 2003, 98:17), MCMV se replicaba a títulos altos en los órganos viscerales de los ratones susceptibles BALB/c que en los ratones C57BL6, particularmente en la fase inicial de la infección. Sin embargo, PTX3 reducía significativamente la carga viral en esta fase temprana, particularmente en el pulmón y el bazo, donde el efecto era similar al de GCV una semana después de la infección. El efecto antiviral era más acusado en el pulmón y el bazo de los ratones susceptibles (diferencias mayores que 2 log) que en los ratones resistentes. El título viral era menor en el hígado de los ratones C57BL6 resistentes que en los ratones susceptibles BALB/c y se veía prácticamente inafectado por el tratamiento con PTX3. El tratamiento prolongado (2 semanas) con PTX3 era más eficaz, particularmente en el pulmón y el bazo (Figura 2A). El tratamiento con PTX3 mejoraba también notablemente la patología inflamatoria y el reclutamiento celular en el pulmón, el bazo y el hígado de los ratones susceptibles. Estos resultados sugieren que PTX3 podría ser un componente importante de la respuesta inmune antiviral del hospedador. Para abordar directamente esta cuestión, se midieron los niveles de PTX3 producido durante la infección y se evaluó la susceptibilidad de los ratones PTX3^{-/-} a MCMV así como la sensibilidad a la administración exógena de PTX3. Los niveles circulantes de PTX3 no se veían incrementados después de la infección (desde 16,0 a 16,7 ng/ml en BALB/c y desde 14,0 a 16,0 ng/ml en los ratones C57BL6). Sin embargo, los niveles locales en el pulmón se incrementaban notablemente, en particular en los ratones BALB/c (desde 0,5 a 2,13 ng/ml). Coherentemente con estos hallazgos, los ratones PTX3^{-/-} eran más susceptibles a la infección que los ratones PTX3^{+/+} particularmente de pulmón, cuyo título viral se reducía notablemente después de tratamiento con PTX3. PTX3 no modificaba el título viral bajo en el hígado de los ratones PTX3^{-/-} (Figura 2B). Es interesante que PTX3 reducía notablemente la carga viral en las glándulas salivares de estos ratones. El examen histológico del pulmón de los ratones infectados revelaba una patología inflamatoria más grave en los ratones PTX3^{-/-} que en los ratones PTX3^{+/+}, constituida por reclutamiento celular fuerte asociado con signos de destrucción parenquimática, fibrosis peribronquial e hiperplasia de las células Globet. En ambos tipos de ratones, sin embargo, el tratamiento con PTX3 mejoraba notablemente la respuesta inflamatoria (Figura 2C). En conjunto, estos datos sugieren que PTX3 contribuye a la respuesta inmunitaria del hospedador a MCMV y que el suministro exógeno de PTX3 puede tener efectos antivirales decisivos.

Dado que la reactivación de HCMV latente después de trasplante alogénico es un problema clínico importante, se evaluó también el efecto de PTX3 en la reactivación de MCMV en HSCT experimental. Dado que la seropositividad a HCMV del donante o receptor podría estar asociado con un riesgo incrementado de complicaciones mediadas por el sistema inmunitario (Lancet 2004, Infect Dis. 4:725), se evaluó la actividad de PTX3 en receptores MCMV⁺ o donantes MCMV⁺, utilizando ratones susceptibles o resistentes. En cada combinación, la reactivación de MCMV ocurría dentro de 10 a 20 días después del injerto, como se revelaba por la supervivencia reducida y la replicación viral elevada en el pulmón. El tratamiento con PTX3, sin embargo, prevenía por completo la reactivación viral, como se revelaba por la supervivencia a largo plazo y replicación viral prácticamente ausente (Figura 2D).

PTX3 protege los ratones infectados por MCMV contra la aspergillosis pulmonar invasiva

10 La replicación de HCMV predispone a complicaciones graves, que incluyen superinfección por *Aspergillus* spp. (Oncology (Williston Park) 2000, 14:1701).

15 Como se ha demostrado ya, PTX3 juega un papel no redundante en la inmunidad antifúngica del hospedador y el tratamiento con PTX3 prevenía la aspergillosis en HSCT experimental (Nature 2002, 420: 182). Para evaluar si el tratamiento de los ratones infectados por MCMV con PTX3 reduce también el riesgo de aspergillosis invasiva, ratones infectados con MCMV se trataron con PTX3 durante una semana y se infectaron intratraquealmente con conidios de *Aspergillus* una semana más tarde. Los resultados demostraron que la pre-infección con MCMV aumentaba la infectividad fúngica, como se revelaba por una carga fúngica incrementada en los órganos diana. El tratamiento con PTX3, sin embargo, reducía casi por completo el crecimiento fúngico y restablecía la resistencia antifúngica (Figura 2E).

20 **PTX3 recupera la reactividad DC/NK y promueve la producción de citocinas en la infección por MCMV**

Una de las características más llamativas de la infección por MCMV de los ratones BALB/c susceptibles es la desaparición temprana de CD8 α +DC del bazo, debido probablemente a la falta de células NK que soportan este subgrupo DC (Nat. Immunol. 2001, 2:1077, Nat. Immunol. 2003, 4:175).

La expansión de ambas poblaciones de células

25 CD8 α ⁺DC y Ly49H NK está regulada de hecho recíprocamente en la infección (Mol. Immunol. 25, 42:547).

Los inventores buscaron por tanto el efecto de PTX3 sobre la expansión y actividad funcional de subgrupos DC y células NK en el bazo y el pulmón de los ratones infectados con MCMV. La Figura 3 muestra que el tratamiento con PTX3, si bien no afectaba a la expansión de las células T CD4⁺ o CD8⁺ en ambos órganos (A), expandía los subgrupos CD11c+DC y CD8 α +DC en el bazo (B), y las células NK1.1+NK tanto en bazo como en pulmón (C). Las células NK se activaban totalmente como se revelaba por la expresión incrementada del marcador de activación CD69 (D). La frecuencia de las células productoras de IFN γ y la actividad citotóxica de las células NK esplénicas purificadas ex-vivo se veían ambas reguladas significativamente en sentido creciente después de tratamiento con PTX3 (Figura 3E). El tratamiento con PTX3 fallaba en lo referente a expandir y activar las células NK en los ratones no infectados.

35 Dado que la activación temprana de las células NK en la infección por MCMV está mediada por IFN- α / β que promueve citotoxicidad y proliferación de las células NK, e IL-12 que induce la producción de IFN- γ (J. Exp. Med. 2003, 197:885), se evaluó el patrón de producción de citocinas por subgrupos DC expuestos a MCMV en presencia de PTX3. Se recurrió a subgrupos CD11+DC y pDC derivados de médula ósea de ratones BALB/c no infectados para permitir diferenciar el efecto de PTX3 sobre DC del efecto sobre el virus propiamente dicho. Se pretrataron DC con PTX3 antes de la infección viral o no se trataron y se infectaron con MCMV tratado con PTX3. En línea con hallazgos anteriores (Nat. Immunol. 2005, 1011), ambos subgrupos DC producían IFN- α e IL-12p70 en respuesta al virus, aunque pDC más que CD11+DC. PTX3 incrementaba las producciones de ambas citocinas, pero particularmente IL-12p70, tanto después del tratamiento con células como con virus pero sólo sobre CD11c+DC (Figura 4^a) y se inducían, aunque en menor proporción, con DC de ratones C57BL6. Estos datos, junto con los de la Figura 1, indican que PTX3 no afecta a la infectividad ni al programa de activación de pDC en respuesta a MCMV, en oposición a CD11+DC cuya infectividad y producción de citocinas se veían totalmente afectadas por PTX3.

Para correlacionar el patrón de producción de citocinas in vitro con el existente in vivo, se midió la producción de IL-12p70, IFN- α , IFN- γ e IL-10 en sobrenadantes de cultivo de células de bazo de ratones con infección primaria de MCMV y tratados con PTX3. Se compararon también los niveles de producción de citocinas entre ratones susceptibles y resistentes así como ratones PTX3^{-/-} y PTX3^{+/+}. Se encontró que el tratamiento con PTX3 daba como resultado una producción incrementada de todas las citocinas en ratones tanto susceptibles (BALB/c y PTX3^{-/-}) como resistentes (C57BL6 y PTX3^{+/+}), aunque en menor grado en los últimos (Figura 4B). En conjunto, estos datos sugieren que PTX3 promueve el camino dependiente de IL-12 más que el dependiente de INF- α en respuesta a MCMV. Esto se confirmó también en el modelo de reactivación, en el cual la protección por PTX3 estaba correlacionada con la activación del camino dependiente de IL-12p70/IFN- γ , en particular en condiciones de seropositividad de los receptores (Figura 4C).

La eficacia de PTX3 depende del camino dependiente de IL-12p70/IFN- γ

Para evaluar directamente el papel relativo de la producción de INF- α , IL-12p70 e INF- γ en la eficacia protectora de PTX3 en la infección aguda de MCMV, se evaluó la eficacia relativa de PTX3 en ratones deficientes para INF- γ , IL-12p40 e INF- $\alpha\beta$ R. Como ya se ha informado (J. Exp. Med. 2003, 197:885), la deficiencia en INF- γ o INF- $\alpha\beta$ R aumentaba notablemente la susceptibilidad a la infección, como se revelaba por un aumento mayor que 1 log de la carga viral en el pulmón en comparación con los ratones WT correspondientes. En contraste, la deficiencia de IL-12p40 no aumentaba significativamente la carga viral (desde $3,4 \times 10^3$ a $4,2 \times 10^3$, WT frente a ratones IL-12p40^{-/-}) (Figura 5A). PTX3 inhibía en más de 1 log la carga viral en INF- $\alpha\beta$ R^{-/-}, efecto que era superior al observado en los ratones WT. En contraste, la actividad inhibidora se reducía significativamente en INF- γ ^{-/-} o IL-12p40^{-/-} comparada con los ratones de control WT correspondientes (desde 6,3 a 6 log₁₀ en INF- γ ^{-/-} frente a 4,8 a 3,4 log₁₀ en BALB/c WT, y desde 3,6 a 3,4 log₁₀ en IL-12p40^{-/-} frente a 3,4 a 2,9 log₁₀ en C57BL6 WT después de tratamiento con PTX3) (Figura 5A). Tanto IL-12 como INF- γ se producían a niveles elevados en los ratones INF- $\alpha\beta$ R^{-/-} tratados con PTX3, un hallazgo que confirmaba el papel preeminente del eje IL-12p70/INF- γ en el efecto protector de PTX3.

PTX activa la detección de MCMV independiente de TLR9/MyD88

La vigilancia inmune eficaz anti-MCMV requería señales funcionales TLR, en particular el camino de señalización TLR9/MyD88 tiene un papel crucial para un aclaramiento rápido de MCMV, mientras que TLR2, TLR3 y TLR4 no parecían jugar un papel significativo (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004, 101: 3516). Para evaluar el papel de TLR en la eficacia de PTX3 en la infección aguda, ratones deficientes en cuanto a la señalización de TLR se enfrentaron a MCMV y se siguieron en cuanto a replicación viral en el pulmón. De acuerdo con datos publicados (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004, 101: 3516), los ratones TLR9^{-/-} y, particularmente, los MyD88^{-/-} eran más susceptibles a MCMV que los ratones C57BL6, mientras que la deficiencia respecto a TLR2 y TLR4 no afectaba significativamente a la resistencia del ratón (Figura 5B). No sólo PTX era todavía eficaz en los ratones TLR9^{-/-} y MyD88^{-/-}, sino que su eficacia se incrementaba aparentemente, en particular en los ratones MyD88^{-/-}, en comparación con los ratones C57BL6 (desde 3,4 a 2,9 log₁₀ en WT frente a 4,8 a 3,2 log₁₀ en los ratones MyD88^{-/-} y 3,9 a 3 log₁₀ en los ratones TLR9^{-/-} después de tratamiento con PTX3). Resulta interesante que PTX3 era completamente ineficaz en los ratones TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-}, un hallazgo que sugiere la posible implicación de estos TLRs en la activación de la respuesta inmune antiviral por PTX3. Una vez más, en este caso, la eficacia de PTX3 estaba correlacionada directamente con los niveles de IL-12 e INF- γ que eran significativamente mayores en los sobrenadantes de los esplenocitos de ratones MyD88^{-/-} y TLR9^{-/-}, cuya producción era baja por lo demás, como ha sido demostrado ya por otros (J. Immunol. 2005, 175: 6723), y desaparecía en los ratones TLR2^{-/-} y TLR4^{-/-} (Figura 5). Este hallazgo está en línea con datos publicados que demuestran que, a pesar de una carencia espectacular en el suero, puede producirse un nivel retardado pero significativamente alto de INF- γ en ratones MyD88^{-/-} y TLR9^{-/-} (J. Immunol. 2005, 175: 6723). Por tanto, dado que el adaptador MyD88 se requiere también para la transducción de señales de todos los restantes TLR, excepto TLR3 (Annu. Rev. Immunol. 2003, 21: 335), los caminos TLR, distintos de TLR9, están involucrados en la detección de MCMV y la respuesta subsiguiente inducida por PTX3.

La presente invención contempla un paquete terapéutico para dispensación a, o para uso en la dispensación a un paciente que está siendo tratado por una enfermedad viral por inhibición de la activación del virus que comprende una o más dosis unitarias, comprendiendo cada dosis unitaria una cantidad de la pentraxina larga PTX3 en el mismo de tal modo que la administración periódica de una o más de dichas dosis unitarias es eficaz para tratar, por ejemplo, HCMV; y un envase farmacéutico acabado para ello, conteniendo o comprendiendo adicionalmente dicho recipiente un marcador, indicando dicho marcador que la pentraxina larga PTX3 está indicada para el tratamiento de pacientes con, por ejemplo, HCMV.

Adicionalmente, la presente invención contempla un artículo de fabricación que comprende material de empaquetamiento y la pentraxina larga PTX3 contenida dentro de dicho material de empaquetamiento, en donde la pentraxina larga PTX3 es terapéuticamente eficaz para el tratamiento de HCMV como se reivindica, y en donde el material de empaquetamiento comprende un marcador que indica que la pentraxina larga PTX3 puede utilizarse para tratar HCMV.

En el uso de acuerdo con la invención, los términos "tratar" o "tratamiento" tienen su significado usual que incluye prevención, prohibición, alivio, inhibición, mejora, detención, represión, ralentización, o inversión de la progresión, activación o reducción de la gravedad de una enfermedad viral.

En el uso de acuerdo con la invención, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto, que es capaz de producir el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de la pentraxina larga PTX3 que se administra en un esfuerzo para tratar una enfermedad viral es aquella cantidad que se requiere para prevenir, prohibir, aliviar, mejorar, detener, reprimir, ralentizar o invertir la progresión, o reducir la gravedad de dicha enfermedad viral, y la dosis diaria a administrar dependerá, de acuerdo con el criterio del médico de atención primaria, del peso, la edad y el estado general del paciente.

La presente invención incluye también métodos que emplean formulaciones farmacéuticas, que contienen, como el ingrediente activo, la pentraxina larga PTX3, en asociación con soportes farmacéuticos. Un profesional experto conocería tales formulaciones y su fabricación, véase, v.g., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, (edición 16^a, 1980).

Las formulaciones se formulan preferiblemente en una forma de dosis unitaria del ingrediente activo. El término "forma de dosis unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para individuos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

- 5 La pentraxina larga PTX3 puede administrarse en la forma de una composición farmacéutica en combinación con soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables, cuyas proporción y naturaleza están determinadas por la solubilidad y las propiedades químicas del compuesto en los soportes y/o excipientes seleccionados, la ruta de administración seleccionada, y la práctica farmacéutica estándar.

10 Las composiciones farmacéuticas se preparan de una manera bien conocida en la técnica de la farmacia, véase, v.g., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, (edición 16ª, 1980).

15 El soporte o excipiente puede ser un material sólido, semisólido, o líquido, que puede servir como vehículo o medio para el ingrediente activo. Soportes o excipientes adecuados son bien conocidos en la técnica. La composición farmacéutica puede estar adaptada para uso oral, por inhalación, parenteral, o tópico y puede administrarse al paciente en la forma de tabletas, cápsulas, aerosoles, inhaladores, supositorios, solución, suspensiones, liposomas o análogos.

DISCUSIÓN DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1

PTX3 se fija a e inhibe la replicación de CMV y el virus de la influenza in vitro

20 (A) Fijación de PTX3 marcado con biotina (PTX3bio⁺) a virus humano (HCMV) o murino (MCMV). Se añadieron concentraciones diferentes de PTX3 no biotinilado (PTX3bio⁻) durante 2 horas a 37°C a placas de HCMV recubiertas con Ag o recubiertas con MCMV, seguido por la adición de concentraciones diferentes de PTX3bio⁺ durante 2 horas más a 37°C. Se leyó la densidad óptica a 450 nm utilizando el Kit de Sustrato de Peroxidasa de Rábano Picante. **P* < 0,05, 1 ó 0,5 µg/ml frente a 5 µg/ml de PTX3bio⁺; ***P* < 0,05, PTX3bio⁺ con y sin PTX3bio⁻. Las barras indican los errores estándar. Para inhibición de la replicación viral, se dejaron sin tratar células MEF y se infectaron con MCMV sin tratar (0), sin tratar e infectadas con MCMV pretratados con 5-0,5 µg/ml PTX3 (V) o pre-incubadas con 5-0,5 µg/ml PTX3[Ⓢ] y se les añadieron luego células sin tratar no infectadas con MCMV. La expresión de los transcritos MCMV gB se evaluó por PCR en tiempo real, 72 horas después de la infección. Los resultados que se muestran representan un experimento representativo de 3 experimentos independientes. (B) Fijación de PTX3bio⁺ a virus de la influenza humana H3N2. Se añadió a placas recubiertas con H3N2 PTX3bio⁻ seguido por PTX3bio⁺ como anteriormente. * *P* < 0,05, PTX3bio⁺ con y sin PTX3bio⁻. Las barras indican los errores estándar. Para inhibición de la replicación viral, se infectaron células MDCK con H3N2 pretratado con 0,5-5 µg/ml de PTX3 y se evaluó la replicación viral por ensayo estándar en placas. Los resultados que se muestran representan un experimento representativo de 3 experimentos independientes. (C) Se generaron DC a partir de progenitores de médula ósea de ratones BALB/c en presencia de GM-CSF (CD11+DC) o Flt3L (plasmacitoide, pDC), infectados con MCMV (indicados como MCMV) y se evaluaron, 48 horas después, en cuanto a morfología por microscopía óptica y replicación viral por PCR en tiempo real como anteriormente. Se expusieron las células a 5 µg/ml de PTX3 durante 2 horas a 37°C antes de la infección (indicada como PTX3+MCMV^a) o a viriones tratados con PTX3 (indicado como PTX3+MCMV^b). -, células no infectadas.

40 FIGURA 2

PTX3 protege contra la infección por CMV y reactivación in vivo

45 (A y B) Se infectaron intraperitonealmente animales con 10⁵ (BALB/c), 5 x 10⁵ (C57BL6, PTX3^{+/+} y PTX3^{-/-}) PFU de MCMV. Los títulos de virus se cuantificaron en células MEF por ensayo estándar en placas sobre tejidos separados en momentos diferentes. Se administraron PTX3 y GCV comenzando el día de la infección. Los controles recibieron el diluyente solo. Los títulos virales se expresan como log₁₀ (valor medio ± errores estándar, SE). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes. (C) Análisis histológico de secciones de pulmón teñidas con ácido peryódico-Schiff de ratones PTX3^{+/+} y PTX3^{-/-} infectados con MCMV y tratados con PTX3 (+) como anteriormente o el diluyente (-) durante una semana. El reclutamiento celular asociado con signos de destrucción del parénquima, fibrosis peribronquial e hiperplasia de células Globet (aumentadas x 20 en los recuadros) se observaron en los ratones PTX3^{-/-} más que en los ratones PTX3^{+/+} y se mejoraban por tratamiento con PTX3. La histología se realizó un día después del tratamiento. Aumento x 10 en todos los paneles. (D) Se infectaron ratones BALB/c o C57BL6 con MCMV como anteriormente. Tres meses más tarde, se confirmó la latencia de MCMV por la ausencia de infección MCMV aguda en bazo y pulmón. Se utilizaron ratones infectados como receptores de células de médula ósea no infectadas de donantes alogénicos (receptores MCMV⁻) o como donantes de células de médula ósea (donantes MCMV⁺) a inyectar en receptores no infectados. Se administró diariamente PTX3 (1 mg/kg/vía intraperitoneal) durante 2 semanas, comenzando el día después del HSCT. Los ratones moribundos o supervivientes (sacrificados 30 días después del HSCT) se evaluaron respecto a cargas virales de MCMV en los

pulmones por ensayo de placas. MST, tiempo medio de supervivencia (días). Las barras indican los errores estándar. * $P < 0,05$, carga viral en el pulmón entre ratones tratados y sin tratar. (E) Ratones BALB/c infectados con MCMV recibieron conidios de *Aspergillus* por vía intravenosa 2 semanas después de la infección viral y tratamiento subsiguiente con PTX3 (1 mg/kg/intraperitoneal) diariamente durante una semana. La cuantificación del crecimiento fúngico se hizo 3 días después de la infección por el ensayo de quitina y los resultados se expresan como contenido de quitina (microgramos de glucosamina/órgano). Las barras indican los errores estándar. * $P < 0,05$, carga fúngica de los ratones infectados con MCMV frente a ratones no infectados. ** $P < 0,05$, carga fúngica en ratones tratados con PTX3 frente a ratones infectados con MCMV sin tratar.

FIGURA 3

10 PTX3 soporta la activación de células dendríticas y células NK in vivo

Análisis fenotípico de células totales de bazo y de pulmón (A, C), células de bazo DC (B), células NK de bazo y pulmón (D) de ratones BALB/c infectados con MCMV sin tratar (-) o un día después de una semana de tratamiento (+) con PTX3 (1 mg/kg/intraperitoneal). Ninguno, ratones no infectados. Los números se refieren al porcentaje de células positivas en el análisis FACS. (E) Actividad citotóxica (por el ensayo estándar de liberación de ^{51}Cr contra dianas YAC-1) y frecuencia de células esplénicas NK productoras de IFN- γ por el ensayo ELISPOT de ratones BALB/c infectados y tratados como anteriormente. Las barras indican los valores estándar. * $P < 0,05$, ratones infectados frente a no infectados. ** $P < 0,05$, ratones tratados con PTX3 frente a ratones infectados sin tratar. Los resultados que se muestran representan 3 experimentos representativos de 5 experimentos independientes.

FIGURA 4

20 PTX3 promueve la producción de citocinas

(A) Se generaron DC a partir de progenitores de médula ósea de ratones BALB/c en presencia de GM-CSF (CD11c $^+$) o Flt3L (pDC). Para la producción de citocinas, se pre-expusieron DC a 5 $\mu\text{g/ml}$ de PTX3 antes de la infección ^(a) o se dejaron sin tratar y se infectaron con virus tratado con PTX3 ^(b). Las citocinas se determinaron en los sobrenadantes de cultivo por el ensayo ELISA y se expresan como pg/ml. Las barras indican los errores estándar. * $P < 0,05$ (producción de citocinas en DC infectadas con MCMV frente a DC no infectadas. ** $P < 0,05$, DC infectadas con virus tratado con PTX3 frente a DC tratadas con PTX3. (B) Producción de citocinas en los ratones durante la infección con MCMV. Niveles de citocinas (como pg/ml) en sobrenadantes de cultivo de células de bazo de ratones con infección primaria de MCMV y tratadas con PTX3. * $P < 0,05$, ratones tratados con PTX3 frente a ratones sin tratar. (C) Producción de citocinas en el modelo de reactivación de MCMV. Ratones BALB/c o C57BL6 se infectaron con MCMV. Los ratones infectados se utilizaron como receptores de células de médula ósea no infectadas de donantes alogénicos (receptores MCMV $^+$) o como donantes de células de médula ósea (donantes MCMV $^+$) a inyectar en receptores no infectados. Se administró diariamente PTX3 (1 mg/kg/intraperitoneal) durante 2 semanas, comenzando el día después del HSCT. Los niveles de citocinas (pg/ml) en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo se determinaron por ensayo ELISA. Las barras indican los errores estándar. * $P < 0,05$, ratones tratados con PTX3 frente a ratones sin tratar.

FIGURA 5

La actividad de PTX3 es dependiente de IL-12/IFN- γ e independiente de TLR9/MyD88

(A) Infección y carga viral de los ratones BALB/c, IFN- γ $^{-/-}$, C57BL6, IL-12p40 $^{-/-}$ e IFN- $\alpha\beta$ $^{-/-}$ después de infección por MCMV y tratamiento con PTX3. Los animales se infectaron por vía intraperitoneal con 10^5 (BALB/c, IFN- γ $^{-/-}$), 5×10^5 (C57BL6, IL-12p40 $^{-/-}$ e IFN- $\alpha\beta$ $^{-/-}$) PFU de MCMV. Los títulos de virus se cuantificaron en células MEF por ensayo estándar en placas sobre tejidos de pulmón separados a los 7 días después de la infección. Se administró PTX3 (1 mg/kg/intraperitoneal) comenzando el día de la infección, diariamente durante una semana. Los controles recibieron el diluyente solo. Los títulos virales se expresan como \log_{10} . Las barras indican los errores estándar. * $P < 0,05$, ratones MCMV tratados frente a ratones MCMV sin tratar. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

(B) La replicación de MCMV en ratones C57BL6, TLR2 $^{-/-}$, TLR4 $^{-/-}$, TLR9 $^{-/-}$ y MyD88 $^{-/-}$, tratados con PTX3. Los ratones se inocularon intraperitonealmente con 5×10^5 (C57BL6, TLR4 $^{-/-}$, TLR9 $^{-/-}$, MyD88 $^{-/-}$) PFU de MCMV y PTX3 tratados como anteriormente. Se determinaron los títulos de MCMV en el pulmón por ensayo en placa una semana después de la infección. Los controles recibieron el diluyente solo. Los títulos virales se expresan como \log_{10} . Las barras indican los errores estándar. * $P < 0,05$, ratones MCMV tratados frente a ratones MCMV sin tratar. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

REIVINDICACIONES

1. Uso de la pentraxina larga PTX3, para preparación de un medicamento para la inhibición de la activación de virus en un individuo mamífero que padece una infección de virus latente.
- 5 2. Uso conforme a la reivindicación 1, en el cual el virus se selecciona del grupo constituido por herpesvirus; virus de la influenza, paramixovirus; HIV; o virus de la hepatitis.
3. Uso conforme a la reivindicación 2, en el cual el herpesvirus es citomegalovirus (CMV); el virus de la influenza se selecciona del grupo constituido por H1N1, H3N2, H5N1 o H5N7; el virus paramixovirus es virus de las paperas o Virus Respiratorio Sincitial.
- 10 4. Uso conforme a la reivindicación 1, para tratamiento del síndrome inducido por citomegalovirus, en el cual: dicho síndrome es mononucleosis por CMV; dicho síndrome está asociado con un hospedador inmunodeficiente; dicho hospedador inmunodeficiente padece SIDA; o dicho hospedador inmunodeficiente es un receptor de trasplante(s) de órganos.
5. La pentraxina larga PTX3 o una composición que comprende la pentraxina larga PTX3 para uso en la inhibición de la activación de virus en un individuo mamífero que padece una infección latente por virus.

15

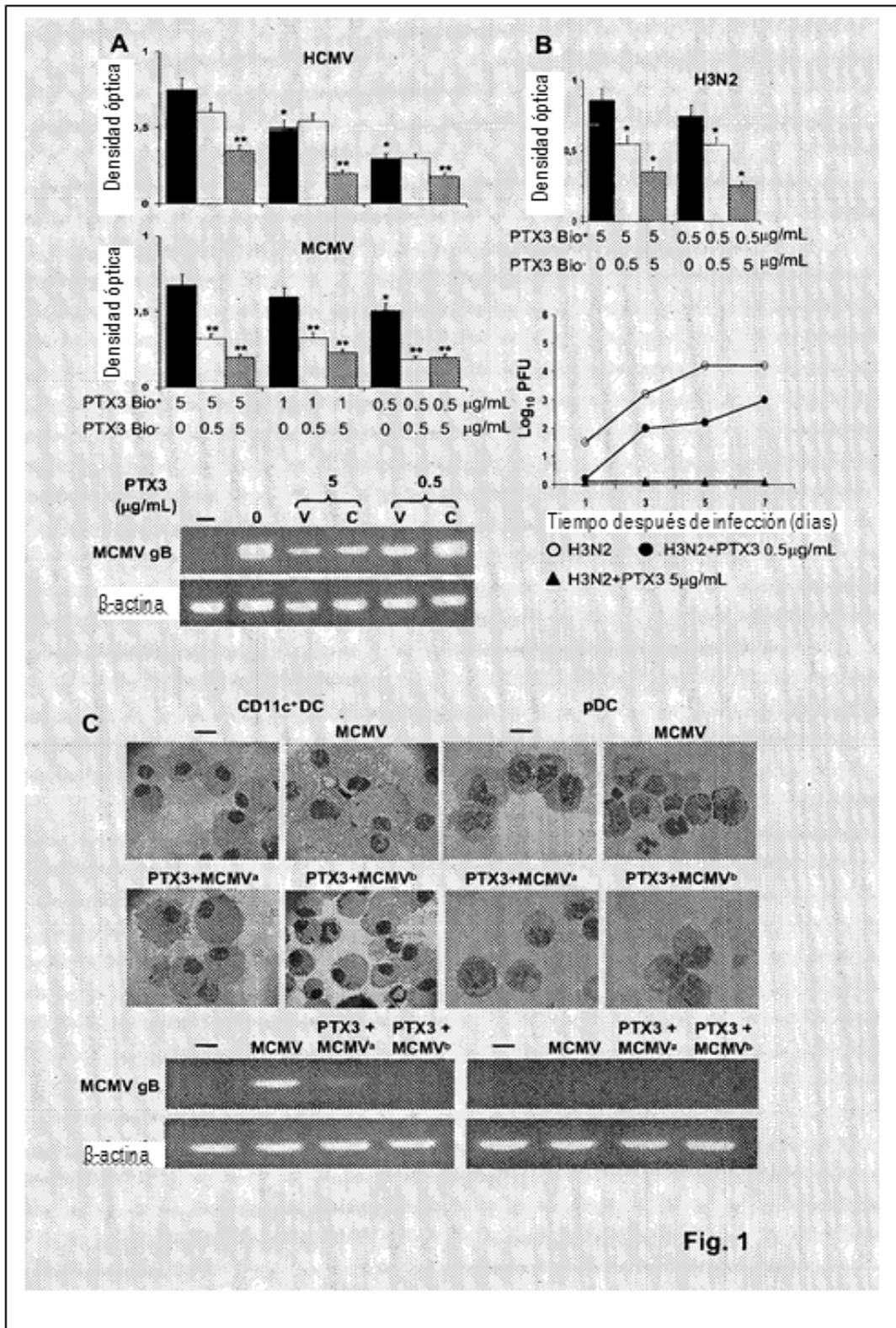


Fig. 1

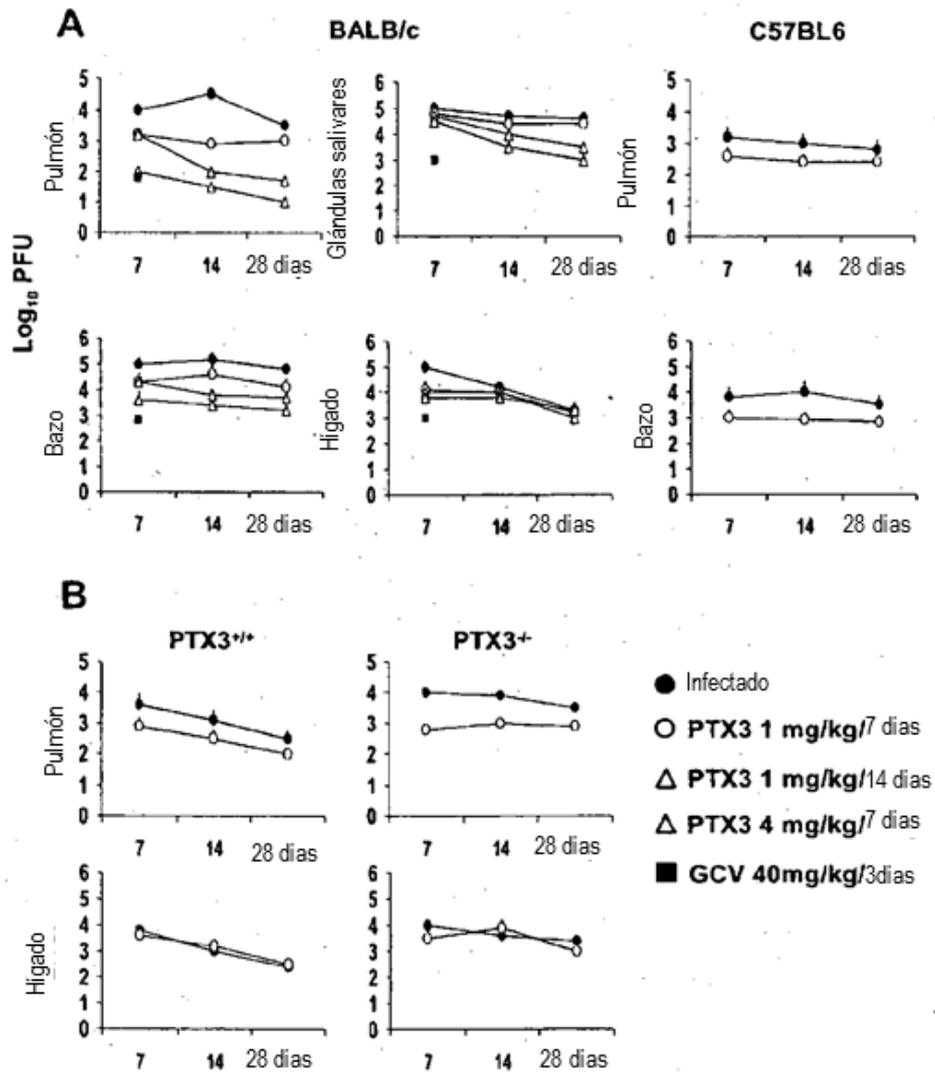
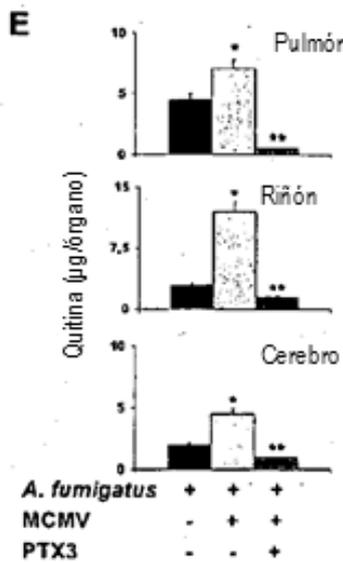
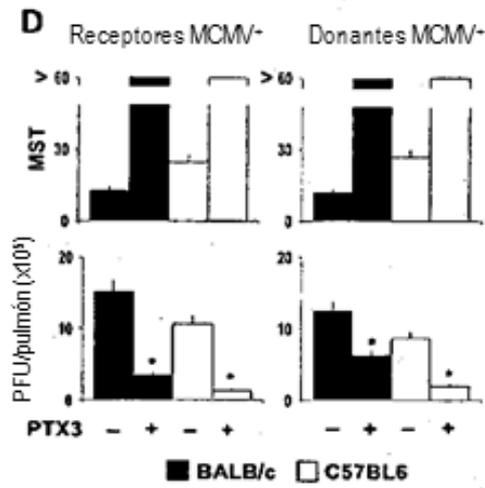
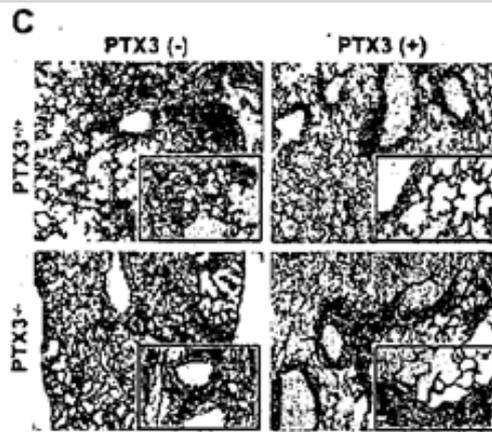


Fig 2 A, B



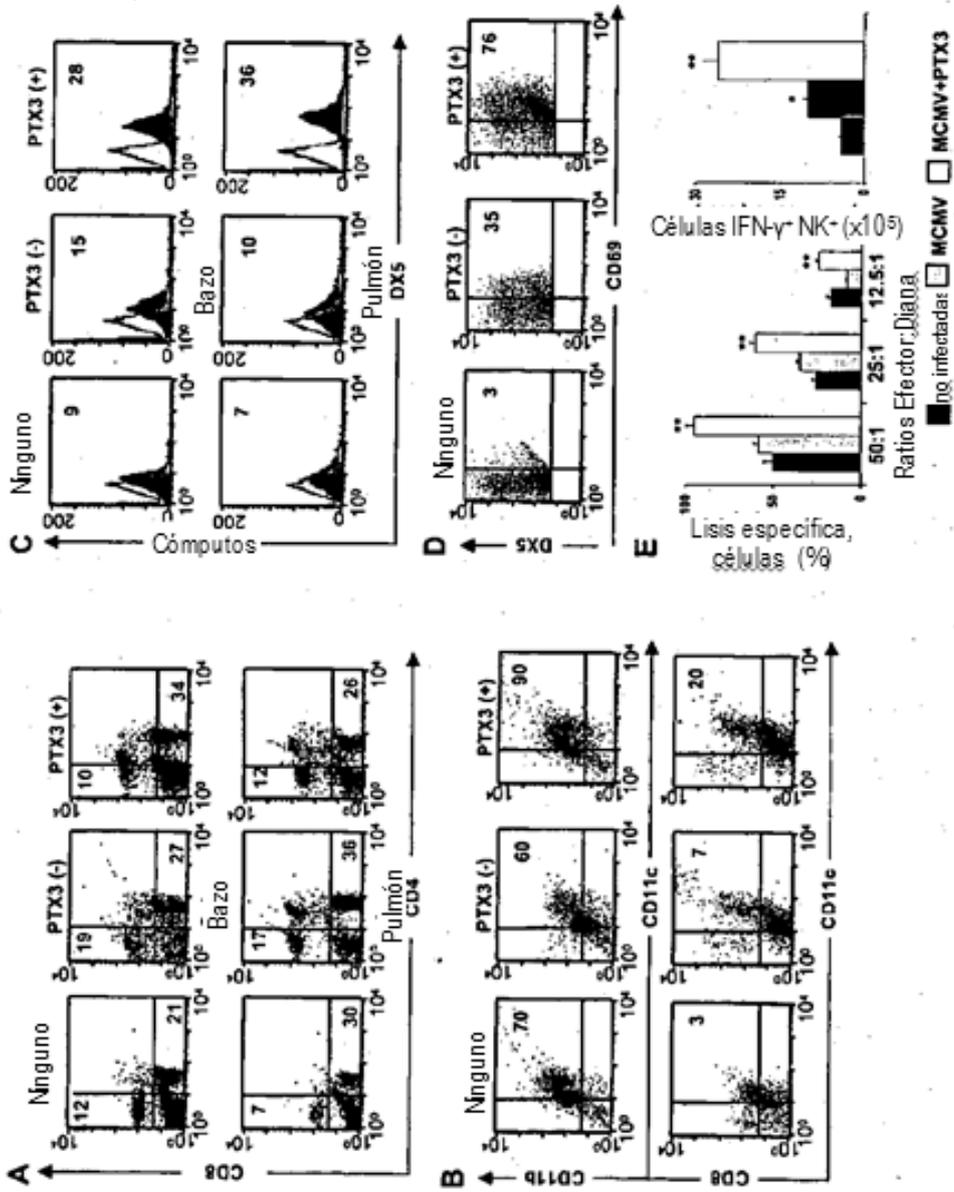
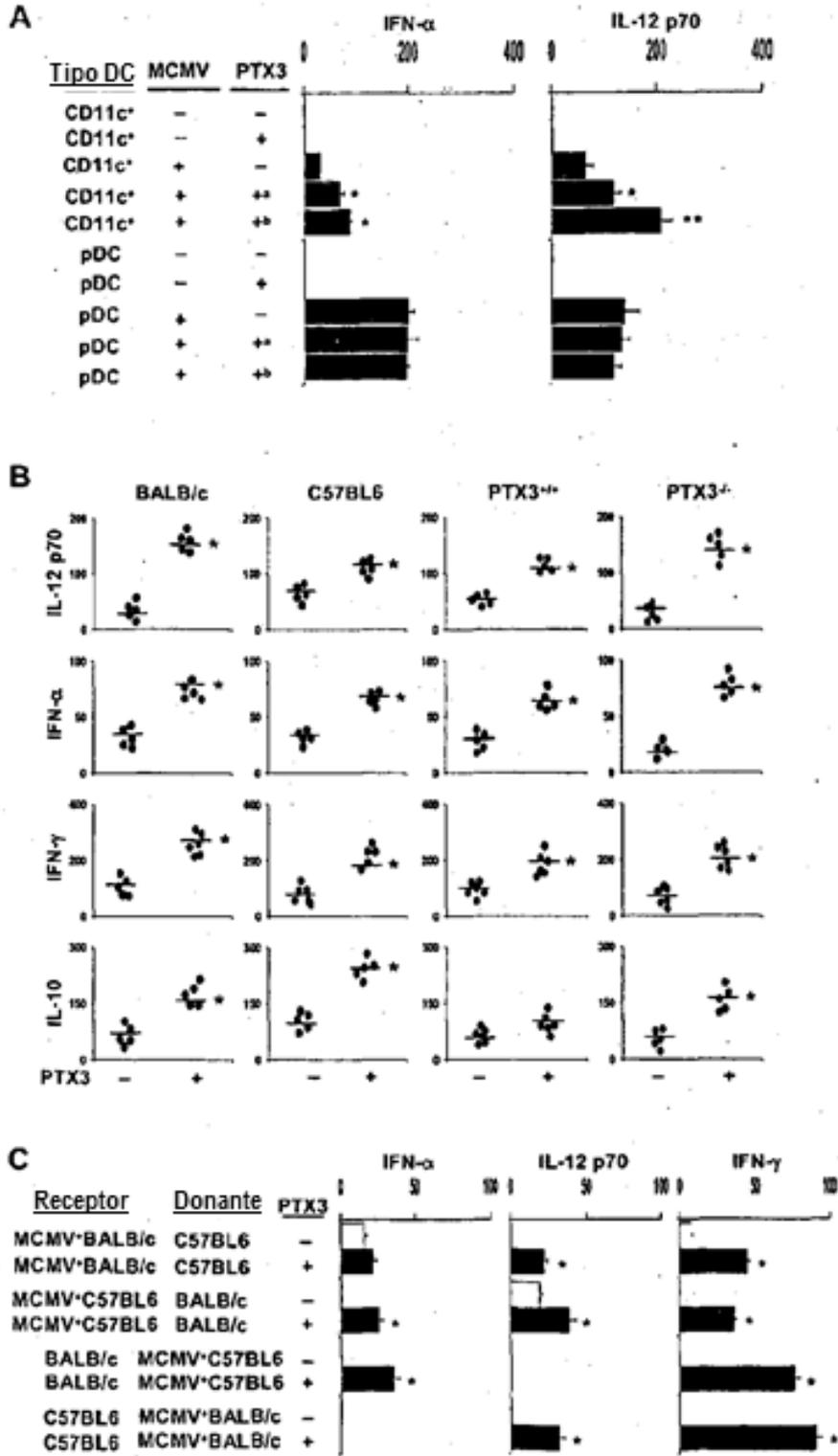


Fig 3



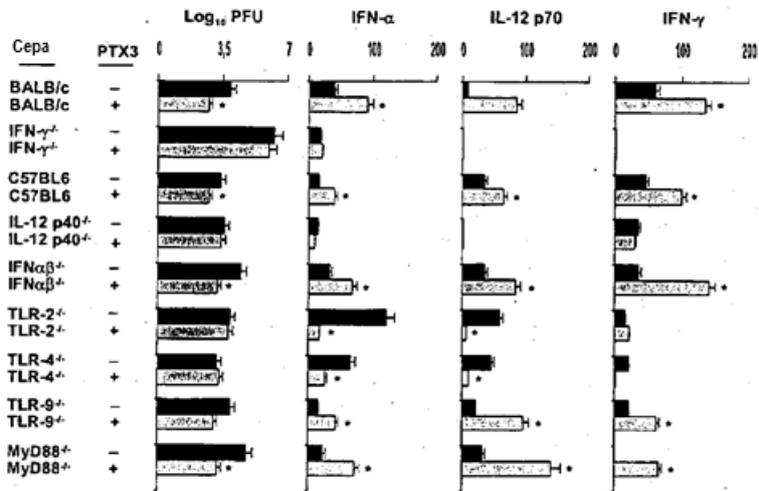


Fig 5