

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 528**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

C07K 14/565 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2011 PCT/GB2011/050480**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011 WO11110861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2011 E 11730046 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2544705**

54 Título: **Interferón beta para uso en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias inferiores causada por influenza**

30 Prioridad:

17.05.2010 GB 201008114

12.03.2010 GB 201004144

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

30.11.2016

73 Titular/es:

**SYNAIRGEN RESEARCH LIMITED (100.0%)
Mailpoint 810, Level F, South Block,
Southampton General Hospital
Southampton SO16 6YD, GB**

72 Inventor/es:

**TEAR, VICTORIA JANE;
ROBERTS, JAMES JONATHAN WELCH y
MONK, PHILLIP DAVID**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 592 528 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

Interferón beta para uso en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias inferiores causada por influenza

Campo de la invención

5 La presente descripción se refiere al tratamiento de las personas con enfermedad de las vías respiratorias inferiores que se ha desarrollado durante o después de una enfermedad similar a la influenza (ILI) establecida. Por una enfermedad similar a la influenza establecida, nos referimos a una enfermedad en la que los síntomas han sido evidentes, por ejemplo, para el individuo o para un cuidador, durante al menos 48 horas. Más específicamente, la divulgación se refiere al tratamiento de individuos con una enfermedad de las vías respiratorias inferiores que se ha desarrollado durante o después de una ILI, en particular pacientes hospitalizados, mediante la administración de interferón- β (IFN- β) por medio de aerosol a las vías respiratorias inferiores. La enfermedad similar a la influenza es una enfermedad caracterizada por fiebre $> 37.8^{\circ}\text{C}$, más dos de los siguientes síntomas: (dolor de cabeza, tos, dolor de garganta, y mialgia) e infección por influenza confirmada.

Antecedentes de la invención

15 La influenza estacional es una infección común, especialmente durante el invierno. Cada año cepas de la influenza (tipo A o B) circulan, dando lugar a las consultas clínicas en atención primaria, episodios de tratamiento en el hospital (sobre todo en las personas mayores y los niños pequeños, pero ocasionalmente en adultos de mediana edad), y muertes (sobre todo en las personas mayores). El tratamiento en la atención primaria y el hospital puede ser necesario debido a los efectos directos de la infección por el virus de la influenza o de sus posibles complicaciones, con mayor frecuencia infección bacteriana secundaria. Los aumentos en las consultas de atención primaria para ILI y presiones de cama de invierno se asocian frecuentemente con períodos de actividad conocida de la influenza en la comunidad.

20 La influenza pandémica ocurre cuando surge un nuevo subtipo de virus de la influenza, que es marcadamente diferente de los subtipos y cepas que circulan recientemente, y es capaz de:

- infectar a los humanos;
- propagarse de manera eficiente de persona a persona;
- 25 • causar enfermedad clínica significativa en una alta proporción de las personas infectadas.

Dado que el virus es nuevo en los seres humanos, una alta proporción de la población tiene poca o ninguna inmunidad, produciendo un gran número de personas susceptibles; de acuerdo con lo anterior, la enfermedad se propaga amplia y rápidamente.

30 Previamente se han propuesto los interferones, ya sea para la intervención en fase inicial o profiláctica en el tratamiento de la influenza, pero con éxito limitado.

La influenza altamente patógena es una forma virulenta de la influenza, tal como H5N1, lo que conduce a un nivel rápido y elevado de morbilidad.

ILI incluye influenza estacional, influenza pandémica e influenza altamente patógena.

35 Se ha encontrado ahora un nuevo método de tratamiento de los individuos, particularmente los pacientes hospitalizados, con enfermedad de las vías respiratorias inferiores que se ha desarrollado durante o después de una ILI.

Resumen de la invención

40 De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona el interferón- β (IFN- β) para uso en el tratamiento de la enfermedad de las vías respiratorias inferiores que se ha desarrollado durante o después de una enfermedad similar a la influenza (ILI) establecida, en donde dicho tratamiento es mediante administración de aerosol de dicho medicamento en las vías respiratorias inferiores; en donde ILI se define como (a) una fiebre $> 37.8^{\circ}\text{C}$ más dos de los siguientes síntomas: dolor de cabeza, tos, dolor de garganta y mialgia y (b) influenza confirmada; en donde ILI establecida significa una enfermedad en la que los síntomas han sido evidentes durante al menos 48 horas; en donde la enfermedad de las vías respiratorias inferiores es causada por la influenza; y en donde el IFN- β es administrado a las vías respiratorias inferiores por medio de aerosol al menos 48 horas después de que los síntomas de ILI se hacen evidentes.

45 La invención proporciona además un producto para su uso en el tratamiento de la enfermedad de las vías respiratorias inferiores que se ha desarrollado durante o después de una enfermedad similar a la influenza (ILI) establecida, que comprende (i) IFN- β y (ii) un inhibidor de la neuraminidasa inhalado, para administración de aerosol simultánea, separada o secuencial a las vías respiratorias inferiores; en donde ILI se define como (a) una fiebre $> 37.8^{\circ}\text{C}$ más dos de los siguientes síntomas: dolor de cabeza, tos, dolor de garganta y mialgia y/o (b) influenza confirmada; en donde ILI

establecida significa una enfermedad en la que los síntomas han sido evidentes durante al menos 48 horas; en donde la enfermedad de las vías respiratorias inferiores es causada por la influenza; y en donde el IFN- β es administrado a las vías respiratorias inferiores por medio de aerosol al menos 48 horas después de que los síntomas de ILI se hacen evidentes.

5 Breve descripción de las figuras

La figura 1a muestra el aumento en el porcentaje de células epiteliales bronquiales del pulmón humanas infectadas durante un período de 96 horas después de la infección con virus de influenza A y el efecto del tratamiento con IFN- β de 48 horas después de la infección (n=1 experimento).

10 La figura 1b muestra el aumento en el porcentaje de células epiteliales bronquiales del pulmón humanas infectadas durante un período de 96 horas después de la infección con virus de influenza A y el efecto del tratamiento con IFN- β a partir de 48 horas después de la infección (n=3 experimentos incluidos los datos originales).

La figura 2a muestra la propagación del virus durante un período de 96 horas después de la infección de las células epiteliales bronquiales del pulmón humano con virus de influenza A y el efecto del tratamiento con IFN- β de 48 horas después de la infección. La estabilización de la propagación del virus entre las 48 y 96 horas. (n=1 experimento).

15 La figura 2b muestra la propagación del virus durante un período de 96 horas después de la infección de las células epiteliales bronquiales del pulmón humano con virus de influenza A y el efecto del tratamiento con IFN- β de 48 horas después de la infección. La estabilización de la propagación del virus entre las 48 y 96 horas. (n=3 experimentos, incluyendo datos originales).

20 La figura 3 muestra el efecto del tratamiento con IFN- β humano en la expresión de la proteína 1 de resistencia de mixovirus del gen antiviral dependiente de IFN- β (MxA) (n=3) en células de sangre de voluntarios humanos sanos o cynomolgus macaques. La sangre entera se trató con IFN- β (0-1000 UI/mL) durante 4 horas, el ARN se extrajo y se midió el efecto sobre la expresión del gen MxA.

25 La figura 4 muestra el efecto del tratamiento con IFN- β humano en la expresión del gen antiviral dependiente de IFN- β 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5' OAS) (n=3) en las células de sangre de voluntarios humanos sanos o cynomolgus macaques. La sangre entera se trató con IFN- β (0-1000 UI/mL) durante 4 horas, el ARN se extrajo y se midió el efecto sobre la expresión del gen 2'-5' OAS.

30 La figura 5 muestra el efecto protector de IFN- β humano en células de cynomolgus macaques infectadas con la influenza estacional (n=4). Las células de cynomolgus macaques fueron pretratadas con IFN- β (0, 100 o 1000 UI/mL) durante 24 horas antes de la infección con la cepa de la influenza AVictoria/3/75 (H3N2) a una MOI de 0.01. Los sobrenadantes se recogieron 48 horas después de la infección por el virus y se midió la propagación del virus mediante el ensayo en placa. <*> indica p<0.05.

Breve descripción de la lista de secuencias

35 SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de nucleótidos de IFN- β 1a humano. SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de IFN- β 1a humano. SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de nucleótidos de IFN- β 1b humano. SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de IFN- β 1b humano. El IFN- β 1b es idéntico a IFN- β 1a humano, excepto para la sustitución de la cisteína en el residuo 17 con serina.

Descripción detallada de la invención

40 Como se indica anteriormente, la presente invención se refiere a nuevos usos terapéuticos de IFN- β . En particular, se refiere al uso terapéutico de IFN- β por la administración de aerosol a las vías respiratorias inferiores para el tratamiento de personas con diagnóstico de enfermedad de las vías respiratorias inferiores que se ha desarrollado durante o después de una enfermedad similar a la influenza, particularmente aquellos pacientes que han sido admitidos al hospital.

45 Como se señaló anteriormente, se han propuesto anteriormente los interferones para el tratamiento de la fase inicial o profilaxis de ILI. De acuerdo con lo anterior, se han propuesto los interferones para uso ya sea antes de que se manifiesten los síntomas de ILI o en la aparición inicial de tales síntomas. En general, estos interferones se han administrado a las vías respiratorias superiores, por ejemplo, la faringe nasal. Por lo general, el inicio del tratamiento con interferones comienza a las 24 horas de la aparición de los síntomas.

50 Por el contrario, hemos encontrado que los pacientes que han sido hospitalizados con complicaciones derivadas de ILI, en particular, con enfermedad de las vías respiratorias inferiores se pueden tratar mediante la administración por medio de aerosol de un agente de interferón- β a las vías respiratorias inferiores. Normalmente, la hospitalización se produce por lo general 48 horas después de la primera aparición de los síntomas.

Definición de IFN-β.

El término IFN-β como se utiliza en este documento será entendido para referirse a cualquier forma o análogo de IFN-β que retiene la actividad biológica de IFN-β nativa y, preferiblemente, retiene la actividad del IFN-β que está presente en el pulmón y, en particular, el epitelio bronquial y/o alveolar. El IFN-β puede ser idéntico a o comprender la secuencia de IFN-β1a humano (SEQ ID NO: 2) o IFN-β1b humano (SEQ ID NO: 4). IFN-β también se refiere a un polipéptido variante que tiene una secuencia de aminoácidos que varía de la de SEQ ID NO: 2 o 4. Alternativamente, IFN-β puede ser modificada químicamente. Una variante de IFN-β puede ser una variante de origen natural, por ejemplo, una variante que se expresa mediante una especie no humana. También, las variantes de IFN-β incluyen secuencias que varían de la SEQ ID NO: 2 o 4, pero no son necesariamente de origen natural. En toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4, una variante será preferiblemente al menos 80% homóloga a la secuencia basada en la identidad de aminoácidos. Más preferiblemente, el polipéptido es al menos 85% o 90% y más preferiblemente al menos 95%, 97% o 99% homólogo basado en la identidad de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4 sobre la secuencia completa. Puede tener al menos 80%, por ejemplo, al menos 85%, 90% o 95%, de identidad de aminoácidos en un tramo de 40 o más, por ejemplo 60, 80, 100, 120, 140 o 160 o más, aminoácidos contiguos ("homología dura"). La homología se puede determinar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que se puede utilizar para calcular la homología, por ejemplo, utilizado en su configuración por defecto (Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST se pueden utilizar para calcular la homología o alinear secuencias (tales como identificar residuos equivalentes o las secuencias correspondientes (por lo general en su configuración por defecto)), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S.F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero la identificación de pares de secuencia de alta puntuación: (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que ya sea coinciden o satisfacen alguna puntuación T de umbral de valor positivo, cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al, supra). Estos aciertos de la palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP de los contiene. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por lo que la puntuación de alineamiento acumulativo se puede aumentar. Las extensiones para los aciertos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o el final de cualquier secuencia se alcanza. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 10915-10919) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor que aproximadamente 1, preferiblemente menos de aproximadamente 0.1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.01, y más preferiblemente menos de aproximadamente 0.001. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, 20 o 30 sustituciones. Las sustituciones conservadoras se pueden hacer, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla 1. Los aminoácidos, en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden ser sustituidos unos por otros: la Tabla 1 - Sustituciones conservadoras de aminoácidos NO-AROMÁTICO No-polar G A P I L V Polar - sin carga C S T M N Q Polar - cargado D E H K R AROMÁTICO H F W Y

Tabla 1- Sustituciones conservadoras de aminoácidos

| | | |
|--------------|-------------------|---------|
| NO-AROMÁTICO | No-polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar - sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar - cargado | D E |
| | | H K R |
| AROMÁTICO | | H F W Y |

Uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 pueden alternativa o adicionalmente ser borrados. De 1, 2, 3, 4 o 5 a 10, 20 o 30 residuos se pueden eliminar, o más. IFN- β también incluye fragmentos de las secuencias antes mencionadas. Dichos fragmentos retienen la actividad de IFN- β . Los fragmentos pueden tener al menos de 120 o 140 aminoácidos de longitud. Tales fragmentos pueden ser utilizados para producir agentes quiméricos como se describe en más detalle a continuación. IFN- β incluye proteínas quiméricas que comprenden fragmentos o porciones de la SEQ ID NO: 2 o 4. Uno o más aminoácidos pueden ser alternativa o adicionalmente adicionados a los polipéptidos descritos anteriormente. Una extensión puede estar provista en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4 o variante o fragmento del polipéptido de la misma. La extensión puede ser bastante corta, por ejemplo, de 1 a 10 aminoácidos de longitud. Alternativamente, la extensión puede ser mayor. Una proteína de soporte se puede fusionar a una secuencia de aminoácidos descrita anteriormente. Por lo tanto, una proteína de fusión que incorpora uno de los polipéptidos descritos anteriormente se puede utilizar en la invención. IFN- β también incluye SEQ ID NO: 2 o 4 o variantes de los mismos que han sido modificados químicamente. Un número de modificaciones de cadena lateral son conocidas en la técnica y pueden ser realizadas a las cadenas laterales de las proteínas o péptidos descritos anteriormente. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, glicosilación, fosforilación, modificaciones de los aminoácidos mediante alquilación reductora por reacción con un aldehído seguido por reducción con NaBH₄, amidinación con metilacetimidato o acilación con anhídrido acético. La modificación es preferiblemente glicosilación. El IFN- β se puede hacer sintéticamente o por medios recombinantes utilizando métodos conocidos en la técnica. La secuencia de aminoácidos de las proteínas y polipéptidos puede ser modificada para incluir aminoácidos de origen no natural o para aumentar la estabilidad del compuesto. Cuando las proteínas o péptidos se producen por medios sintéticos, tales aminoácidos se pueden introducir durante la producción. Las proteínas o péptidos también pueden ser modificados siguiendo ya sea producción sintética o recombinante. El IFN- β también se puede producir utilizando D-aminoácidos. En tales casos, los aminoácidos se unirán en la secuencia inversa en la orientación C a N. Esto es convencional en la técnica para producir tales proteínas o péptidos. El IFN- β se puede producir en una célula mediante expresión in situ del polipéptido a partir de un vector de expresión recombinante. El vector de expresión lleva eventualmente un promotor inducible para controlar la expresión del polipéptido. El IFN- β o análogo del mismo se puede producir a gran escala después de la purificación mediante cualquier sistema de cromatografía líquida de proteína después de la expresión recombinante. Los sistemas de cromatografía líquida de proteínas preferidos incluyen sistemas FPLC, AKTA, el sistema de Bio-Cad, el sistema Bio-RadBioLogic y el sistema HPLC Gilson. Las formas comercialmente disponibles de IFN- β o análogos de los mismos se pueden usar en la invención. Los ejemplos incluyen Betaseron® y Avonex®.

El IFN- β se puede administrar en un medicamento o composición farmacéutica apropiada para la administración de las vías respiratorias que por lo general también incluirán un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicho "excipiente" se refiere generalmente a un material sustancialmente inerte que es no tóxico y no interactúa con otros componentes de la composición de una manera perjudicial. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden ser incluidas en el mismo, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como hidroclouros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. También se prefiere, aunque no se requiere, que una composición o medicamento que comprende el agente terapéutico contendrán un portador farmacéuticamente aceptable que sirve como estabilizante, en particular para el péptido, proteína, polinucleótido u otros agentes similares. Ejemplos de portadores apropiados que también actúan como estabilizantes para péptidos incluyen, sin limitación, calidades farmacéuticas de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, y similares. Otros portadores apropiados incluyen, de nuevo sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles de alto peso molecular (PEG), y combinación de los mismos. También puede ser útil emplear un lípido y/o detergente cargado. Los lípidos cargados apropiados incluyen, sin limitación, fosfatidilcolinas (lecitina), y similares. Los detergentes serán por lo general un surfactante no iónico, aniónico, catiónico o anfótero. Ejemplos de surfactantes apropiados incluyen, por ejemplo, surfactantes Tergitol® y Triton® (Union Carbide Chemicals anaplastics, Danbury, CT), polioxietilensorbitanos, por ejemplo, surfactantes TWEEN® (Atlas Chemical Industries, Wilmington, DE), éteres de polioxietileno, por ejemplo, Brij, ésteres de ácidos grasos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, lauril sulfato y sales del mismo (SDS), y materiales similares. Una discusión minuciosa de excipientes, portadores, estabilizantes y otras sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables está disponible en Remingtons Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991).

Una composición apropiada para la administración de las vías respiratorias de IFN- β se puede formular, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,030,609 por disolución de IFN- β liofilizado en un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como agua destilada estéril o solución salina fisiológica estéril, opcionalmente con además uno o más portadores, estabilizantes, surfactantes u otros agentes con el fin de mejorar la eficacia del agente activo IFN- β .

Una composición apropiada tiene un pH de 5 a 8, más preferiblemente 5.5 a 7.5. Preferiblemente, la composición está regulada, por ejemplo, utilizando una solución reguladora de citrato.

La composición de Rentschler, que se basa en formulaciones reveladas en US 6,030,609, tiene un pH de 6.5 y una osmolaridad de 290 mOsm/kg. La composición se proporciona preferiblemente como una solución para nebulizador acuosa, lista para el uso, estéril, clara e incolora, presentada en una jeringa de vidrio desechable.

Además del ingrediente activo, la composición comprende preferiblemente un sistema regulador para mantener el pH entre 5 y 8, más preferiblemente 5.5 y 7.5, especialmente 6.5. La composición también comprende preferiblemente un antioxidante, por ejemplo, DL-metionina.

Una composición preferida comprende:

| Ingredientes | Cantidad (por mL) | Función | Monografía |
|----------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------|
| Substancia activa | | | |
| IFN-β1a (RB) | 11.3 MIU (40 µg) | Ingrediente activo | HSE |
| Excipientes | | | |
| Dihidrógeno fosfato de sodio dihidrato | 5.92 mg | Componente regulador | Ph. Eur. |
| Fosfato disódico dihidrato | 2.13 mg | Componente regulador | Ph. Eur. |
| Citrato de sodio | 20.58 mg | Agente quelante, componente regulador | Ph. Eur. |
| DL-metionina | 0.30 mg | Estabilizante, antioxidante | Ph. Eur. |
| Agua para preparaciones inyectables a | 1 mL | Solvente | Ph. Eur. |

5

Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del IFN-β descrito en este documento puede ser convenientemente administrado a las vías respiratorias pulmonares por medio de un dispositivo de inhalación que es capaz de administrar partículas finas del ingrediente activo en las vías respiratorias inferiores o las vías respiratorias. Por lo general, las partículas del ingrediente activo tendrán un diámetro medio de masa de 1-10 micras. Los dispositivos de inhalación apropiados incluyen dispositivos de inhalación de polvo seco (DPI), inhaladores de dosis medidas presurizados (pMDI) y nebulizadores de aerosol.

10

Por lo general, el dispositivo de inhalación producirá un aerosol con un tamaño de partícula, como se determina utilizando un Malvern Masterizer S, con un diámetro medio de masa de 1-10 micras, preferiblemente 3-8 micras, en el que el porcentaje de masa tiene un diámetro por debajo de 5 micras es de 25-80%, preferiblemente 30-65%. Un nebulizador apropiado es el dispositivo I-neb, un nebulizador con marcado CE fabricado por Philips Respironics.

15

Una cantidad eficaz apropiada se puede determinar mediante pruebas clínicas apropiadas y pueden variar con, por ejemplo, la actividad del IFN-β administrado o inducido. El IFN-β por ejemplo, se puede administrar en cantidades de microgramos.

20

Se administran al sujeto que va a ser tratado de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad que sea eficaz para lograr el efecto deseado. La cantidad que se va a administrar por dosis puede ser de 0.1 µg a 500 µg, por ejemplo 1 a 50 µg, dependiendo del sujeto que se va a tratar.

El tratamiento dura normalmente de 5-7 días y puede continuar hasta 14 días si los síntomas persisten. El tratamiento se puede administrar a partir de cada dos días o varias veces al día. Preferiblemente, el tratamiento se administra una vez al día.

25

El IFN-β se puede administrar por sí solo o de forma simultánea, secuencialmente o por separado en combinación con otro compuesto terapéutico. En particular, el IFN-β se puede administrar junto con un compuesto terapéutico usado para tratar la enfermedad respiratoria o antiviral para el individuo. El IFN-β y el compuesto terapéutico adicional se pueden formular en las mismas o diferentes composiciones.

En una realización, el IFN-β se administra a un individuo con asma en combinación con un corticoesteroide inhalado.

30

En una realización adicional, el IFN-β se puede administrar simultánea, secuencialmente o por separado con un inhibidor de la neuraminidasa inhalado. Por lo tanto, en un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un producto para uso en el tratamiento de la enfermedad de las vías respiratorias inferiores (o síntomas) que se han desarrollado durante o después de una enfermedad similar a la influenza establecida, que comprende, la administración simultánea, por separado o secuencial de las vías respiratorias inferiores (i) IFN-β y (ii) un inhibidor de la neuraminidasa inhalado. Preferiblemente, dicho producto proporcionará la administración simultánea, por separado o secuencial de IFN-β y un inhibidor de la neuraminidasa inhalado, por ejemplo, zanamivir. IFN-β y un inhibidor de la neuraminidasa inhalada, por ejemplo, se puede proporcionar en forma de una composición farmacéutica apropiada única para la

35

administración de aerosol a las vías respiratorias, por ejemplo, por medio de un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida presurizado o un nebulizador de aerosol.

Alternativamente, el IFN- β se puede administrar simultánea, secuencialmente o por separado con un inhibidor de la neuraminidasa oral, tal como oseltamivir.

- 5 Alternativamente, el IFN- β se puede administrar simultánea, secuencialmente o por separado con un inhibidor de la neuraminidasa se administra sistémicamente, tal como peramivir.

10 El IFN- β se puede administrar simultánea, secuencialmente o por separado con un inhibidor de la fijación del virus influenza inhalado. Por lo tanto, se proporciona un producto para el tratamiento de personas con diagnóstico de enfermedad de las vías respiratorias inferiores (o síntomas) que se han desarrollado durante o después de una enfermedad similar a la influenza que comprende la administración simultánea, por separado o secuencial en las vías respiratorias inferiores (i) IFN- β y (ii) un inhibidor de la fijación del virus influenza inhalado. Preferiblemente, dicho producto proporcionará la administración simultánea, por separado o secuencial de IFN- β y un inhibidor de la fijación del virus influenza, por ejemplo, la proteína de fusión sialidasa, DAS181 (Fludase®). IFN- β y un inhibidor de la fijación del virus influenza inhalado, por ejemplo, se pueden proporcionar en forma de una composición farmacéutica apropiada única para la administración de aerosol a las vías respiratorias.

15 El IFN- β se puede administrar simultánea, secuencial o por separado con un antibiótico antibacteriano. Preferiblemente el antibiótico antibacteriano se administra por inhalación.

En una realización adicional, el IFN- β se puede administrar simultánea, secuencialmente o por separado con un antibiótico antifúngico. Preferiblemente el antibiótico antifúngico se administra por inhalación.

20 Los niños menores de 5 años, pero especialmente los niños menores de 2 años de edad, adultos de 65 años y mayores, mujeres embarazadas y aquellos con comorbilidades (por ejemplo, enfermedad pulmonar crónica, afecciones neurológicas y del neurodesarrollo, enfermedades del corazón, trastornos de la sangre, trastornos endocrinos, trastornos renales, trastornos hepáticos, trastornos metabólicos, tumores malignos y el sistema inmunológico debilitado debido a una enfermedad o medicamento) están en mayor riesgo de desarrollar complicaciones derivadas de la hospitalización y tienen los resultados más pobres y representan un grupo diana particular de la invención. Las personas mayores, por ejemplo, los de más de 60 años de edad son un grupo diana particular, al igual que los pacientes que sufren de asma y/o COPD.

25 Otro grupo de riesgo son los pacientes que no han sido previamente expuestos a una ILL.

Ejemplo 1

30 La capacidad del IFN- β exógeno para suprimir la infección por influenza A en un modelo *in vitro* de infección establecida de las vías respiratorias inferiores se ilustra en el siguiente ejemplo.

Visión general

35 La enfermedad de las vías respiratorias inferiores (o síntomas) que se desarrollan durante o después de una enfermedad similar a la influenza (ILI) a menudo se precipitan por la propagación de infecciones por el virus de la parte superior a las vías respiratorias inferiores. Por otra parte, los síntomas prolongados y, en pacientes hospitalizados, hospitalizaciones prolongadas están asociados con la propagación del virus persistente de las vías respiratorias inferiores. Utilizando células epiteliales bronquiales del pulmón humanas, un sitio importante de la replicación de la influenza en el hombre, se ha desarrollado un modelo de la infección por influenza A establecida de las vías respiratorias inferiores. Se investigó el efecto de IFN- β en este modelo.

40 Método

Cultivo de células y protocolo de infección

45 Las células epiteliales bronquiales del pulmón humano (HBE) se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM) que contiene glutamax (Invitrogen), 10% de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen), penicilina (50 U/mL) y estreptomycin (50 μ g/mL) (Invitrogen). Las células HBE se sembraron a 1.5×10^5 /pozo, pasaje 41-49, en una placa de 24 pozos. En aproximadamente 60 a 70% de confluencia, las células se cultivaron en medio de suero reducido (MEM que contiene glutamax (Invitrogen) y 0.75-1% de FBS (Invitrogen)) durante 24 horas. Las células se infectaron con una cepa de influenza activada (influenza A/WSN/33 (H1N1) (Retroscreen)) a 0.0001 MOI a 37°C. Después de una hora, el virus no unido se elimina mediante lavado. Se adicionó medio de suero reducido y se incubaron las células a 37°C, durante otros cuatro días. Las células se trataron con 1000 IU/mL de IFN- β 1a humano (Rentschler) 48 horas después de la infección con el virus. Una vez que el tratamiento con IFN- β comenzó, la dosis se repitió cada 24 horas.

Citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas de influenza

Se recolectaron medios celulares a las 24, 48, 72, y 96 horas después de la infección y se almacenó a -80°C . A las 24, 48, 72 y 96 horas después de la infección se tripsinizaron las células, se contaron y se lavaron en solución salina reguladora con fosfato (PBS). Se tomaron hasta 2×10^5 células para su análisis por citometría de flujo. Las células se centrifugaron a 400 g y el sobrenadante se descartó. La mancha de células vivas/muertas (Molecular Probes) se reconstituyó en sulfóxido de dimetilo (DMSO) (500 μL) y se diluyó 1:100 en PBS. La mancha diluida de células vivas/muertas (100 μL) se incubó con las células a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se lavaron en PBS, se centrifugaron a 400 g, y el sobrenadante se descartó. Se adicionaron 250 μL de Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) por tubo y las células se dejaron a 4°C , durante 20 minutos. Las células se lavaron dos veces con 2 mL de solución Perm/Wash (BD Biosciences) por centrifugación a 500 g. Después del segundo lavado, las células se resuspendieron en 100 μL de solución de Perm/Wash y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. El anticuerpo de la proteína de la matriz anti-influenza A (Serotec) se diluyó a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución de Perm/Wash y se adicionaron 100 μL a las células durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con 2 mL de solución de Perm/Wash por centrifugación a 500 g. El IgG-FITC anti ratón (Sigma) se diluyó a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución de Perm/Wash y se adicionaron 100 μL a las células durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Las células se lavaron dos veces con 2 mL de solución de Perm/Wash por centrifugación a 500 g. Las células se resuspendieron en solución de Perm/Wash y se analizaron por citometría de flujo utilizando el FACSCalibur (BD Biosciences) y el software CellQuest Pro. Los datos se analizaron posteriormente utilizando el software WinMDI.

Ensayo de placa para determinar la propagación del virus

Las células de riñón de canino Madin Darby (MDCK), se cultivaron en MEM que contiene glutamax (Invitrogen), 10% de FBS (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (Invitrogen), y penicilina/estreptomina (Invitrogen). Las células MDCK se sembraron a 1×10^5 células/pozo, pasaje 25-30, en una placa de 12 pozos. Al alcanzar una confluencia del 100%, las células se lavaron dos veces con PBS. Los medios celulares recolectados durante el experimento de infección se diluyeron en medio libre de suero (DMEM (Invitrogen), penicilina/estreptomina (Invitrogen), L-glutamina (Invitrogen), aminoácidos no esenciales (Invitrogen), y piruvato de sodio (Invitrogen)) para dar un rango de dilución de diluciones de diez veces entre 1:10 a 1:10⁶. Se adicionó medio celular diluido (200 μL) a pozos por duplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora. El virus se aspiró y las células se lavaron con PBS. Se preparó medio de recubrimiento (100 mL de MEM 10 veces concentrado (Invitrogen), 20 mL de bicarbonato de sodio al 7.5% (Sigma), 10 mL de HEPES 1 M (Fluka), 28 mL de albúmina de suero bovino (BSA) fracción V al 7.5% (Sigma), 5 mL de 1% de DEAE-dextrano (Sigma), 20 mL de penicilina/estreptomina (Invitrogen), 10 mL de glutamina 200 mM (Invitrogen), 507 mL de d.H₂O) y se adicionaron 17.5 mL a 12.5 μL de 1 mg/mL de tripsina tratada con L-(tosilamido-2-fenil) etil clorometil cetona (TRTPCK tripsina) (Worthington Biochemical Corp.) y 7.5 mL de suspensión de Avicel (4.8 g de Avicel (FMC Biopolymer) en 186 mL de d.H₂O). El recubrimiento se mezcló por inversión y se adicionó 1 mL por pozo. Las placas se incubaron durante 2 días sin movimiento o agitación. El medio de recubrimiento se aspiró y las células se lavaron dos veces con PBS. La solución de violeta de cristal (0.5 mL) (0.65 g de cristal violeta (Sigma), 25 mL de formaldehído (Sigma), 25 mL de etanol 100% (Sigma), 450 mL de 1xPBS (5 comprimidos DulA PBS (Sigma) + 500 mL de d.H₂O)) durante 30 minutos a temperatura ambiente. El violeta de cristal se retiró y se lavaron las placas en agua. Las placas se dejaron secar y las placas se contaron.

Se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Se presentan los datos del primer experimento y datos de resumen.

40 Análisis de los datos

Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism

Resultados

En este modelo de análisis de citometría de flujo se sugiere que entre el 5 y 40% de las células están infectadas entre 48 y 96 horas (consultar las figuras 1a y 1b) que es similar a los niveles de las células infectadas productivamente reportados en el ámbito clínico en el pico de la infección (Baccam et al. (2006) Journal of Virology, 80: 7590-7599). De acuerdo con lo anterior este período también se asocia con niveles más altos de la propagación del virus en nuestro modelo (Figura 2a y 2b).

El tratamiento de las células con IFN- β a las 48 horas después de la infección, tratamiento de modelos de infección establecida, causó una gran reducción en la proporción de células infectadas y la propagación del virus (figuras 1a, 1b, 2a y 2b). Una reducción en la carga viral de más de 10 veces se considera que es clínicamente relevante (Barnett et al. (2000) Antimicrob. Agents Chemother 44: 78-87).

Conclusión

Estos resultados muestran que el tratamiento con IFN- β tiene el potencial de alterar el curso de la infección por influenza establecida en los pulmones y por lo tanto reducir las enfermedades de las vías respiratorias que se desarrollan durante o después de una enfermedad similar a la influenza (ILI) establecida. Dado que los pacientes de

edad avanzada y aquellos que sufren de asma y/o COPD es probable que tengan dificultades para hacer IFN-β cuando sea necesario, los usos y métodos descritos en este documento son de especial aplicación a estos grupos vulnerables.

Estudio *in vivo*:

Introducción

- 5 La principal complicación de la enfermedad similar a la influenza es la neumonía viral que se desarrolla después de la propagación del virus en las vías respiratorias inferiores.

10 IFN-β humano es altamente específico a las especies en su actividad biológica. El mono cynomolgus macaque es una especie apropiada para estudiar los efectos de IFN-β humano. Se ha demostrado que el IFN-β humano favorece la expresión de la proteína 1 de la resistencia de mixovirus del gen antiviral dependiente de IFN-β (MxA) (Figura 3) y 2'-5' oligoadenilato sintetasa (2'-5' OAS) (Figura 4) en la misma medida en células de la sangre de cynomolgus macaque y las células de la sangre humana. Además, en los estudios *in vitro* humanos IFN-β protege a las células de cynomolgus macaque de la infección con la influenza (Figura 5).

15 Los modelos preclínicos de enfermedad de las vías respiratorias inferiores se han desarrollado utilizando el mono cynomolgus macaque para los virus de influenza A (H5N1) altamente patógena (Rimmelzwaan et al. (2001) J Virol. 75: 6687-91) e influenza A (H1N1) de la pandemia de 2009 (Herfst et al. (2010) Vet. Pathol. 47: 1040-7). Estos modelos han pronosticado la eficacia clínica de los inhibidores de la neuraminidasa contra la influenza cuando se administra antes de la infección.

20 Este estudio investiga el efecto de IFN-β administrado al pulmón en un modelo de mono cynomolgus macaque de enfermedad de las vías respiratorias inferiores inducida por la influenza. Las cepas del virus de desafío son A/Indonesia/5/05 (H5N1) y A/Paises Bajos/602/2009 (H1N1 pandémica), que ambos han demostrado que se replican en las vías respiratorias inferiores y causan patología pulmonar significativa (Herfst et al. (2010) Vet. Pathol. 47: 1040-7; Rimmelzwaan et al. (2001) J Virol. 75: 6687-91).

25 El estudio comprende dos etapas. En la primera etapa la administración exitosa de IFN-β inhalado se establece por que muestra la expresión inducida de los marcadores antivirales dependiente de IFN-β en las células pulmonares obtenidas por lavado bronco-alveolar (BAL). Datos similares en estudios clínicos han apoyado un mayor desarrollo de IFN-β inhalado como una terapia antiviral. En la segunda etapa, el efecto de tratamiento profiláctico y terapéutico con IFN-β administrado al pulmón sobre la patología pulmonar inducida por la influenza y se investigó la carga viral en el pulmón.

Etapas 1: Confirmación de entrega exitosa de IFN-β al pulmón

30 En resumen, IFN-β, en solución, es administra por nebulizador en dos ocasiones a los pulmones de monos cynomolgus macaque. BAL se recoge antes y después de cada dosis. La expresión de genes de marcadores de antivirales dependientes de IFN-β (MxA, 2'-5' OAS y proteína inducida por interferón gamma de 10 kDa (IP-10) en las células BAL se determina utilizando métodos de PCR cuantitativa. Los niveles de la regulación positiva se comparan con los datos generados en los estudios clínicos con el fin de seleccionar la dosis para la siguiente etapa. A continuación, se describen el horario de estudio y más detalles de los métodos.

| Prueba de Interferón Beta Synairgen del estudio de administración exitosa | | | | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------|--|-----------|------------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------------|-------------|
| Grupo | No/Grupo | Tratamiento | | Día-7 | Día 0 | Día 1 (24 horas) | Día 8 | Día 9 (24H) |
| 1 | 5 | Interferón Beta | | B, W, BAL | B, W, Administración de aerosol de dosis Interferón Beta 1 | B, W, BAL | B, W, Administración de aerosol de Interferón Beta dosis 2 | B, W, BAL |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|--|------------------|
| ALOJAMIENTO | | Estándar (grupo) |
| * BAL = lavado broncoalveolar; W = peso corporal; B = sangre entera para el suero | | |

5 Siete días antes de la administración de IFN-β inhalado, cinco cynomolgus macaques machos, con edades comprendidas de aproximadamente tres años, se anestesiaron con ketamina-dormitor, se recolectaron sangre y lavado broncoalveolar (BAL) recoge y se tomó el peso. BAL implica purgar los pulmones con 10 mL de solución salina reguladora con fosfato con una recuperación prevista de aproximadamente 5 mL. En cada ocasión muestras de BAL se separan en la fracción sobrenadante y celular. Las fracciones Celular se lisan en tampón RLT (Qiagen) y se analizaron para los biomarcadores antivirales MxA IFN-β dependiente, 2'-5' de la OAS, e IP-10 utilizando métodos de PCR cuantitativa.

10 En el día 0, bajo anestesia, se recogió sangre, se tomó el peso y se administraron 3 mL de IFN-β inhalado (Rentschler) a cada macaco. La solución del nebulizador de IFN-β se administra por inhalación utilizando el dispositivo de I-neb (Philips Respironics) acoplado a una mascarilla pediátrica (Philips Respironics, número de pieza HS81110EU-001). El dispositivo I-neb está programado para generar una corriente continua de aerosol cuando está encendido.

En el día 1, bajo anestesia, se recolectaron sangre y BAL y se tomó el peso.

15 En el día 8, bajo anestesia, se recolectó la sangre, se tomó peso y se administran 1.5 mL o 4.5 mL de IFN-β inhalado a cada macaque. La dosis de IFN-β seleccionado dependerá de los resultados obtenidos de la dosis 1.

En el día 9, bajo anestesia, se recolectaron sangre y BAL y se tomó el peso.

Etapa 2: Efecto del tratamiento profiláctico y terapéutico con IFN-β administrado al pulmón en la patología pulmonar inducida por la influenza y carga viral en el pulmón

20 La segunda etapa del estudio incluye tres grupos de tratamiento: Grupo 1 recibe placebo; Grupo 2 recibe tratamiento con IFN-β inhalado 24 horas antes de ser infectadas con virus de desafío y tratamiento diario posterior con IFN-β; Grupo 3 recibe tratamiento con IFN-β inhalado 4 horas después de haber sido infectado con el virus de desafío y posterior tratamiento diario con IFN-β. Los tratamientos terapéuticos se administran 4 horas después de la infección, como en este modelo una dosis relativamente alta del virus se administra directamente en las vías respiratorias inferiores al modelo de enfermedad de las vías respiratorias establecida. Un cálculo del tamaño de la muestra indicó que 9 animales por grupo se requieren para ver un efecto del tratamiento de una diferencia de 1.5 log en el título viral entre los animales tratados y de control (no tratados). Esto se considera que es clínicamente significativo sobre la base de resultados de estudios clínicos con los inhibidores de la neuraminidasa (Barnett et al. (2000) Antimicrob. Agents Chemother. 44: 78-87). El horario de estudio se muestra a continuación:

| Tratamiento Synarigen Interferón beta H5N1/H1N1, Horario desafío & Muestreo | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------|----------------------------|------------------|----------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|------|------|-----------------------|
| Grupo | No/Grupo | Tratamiento | d -14 | Desafío | | | | | | | | Eutanasia S, W, LT, B |
| | | | | d -1 | d 0 | +4 hrs | d 1 | d 2 | d 3 | d 4 | d 5 | |
| 1 | 9 | Vehículo | B, TS | S, W, B | Placebo | DESAFIO Intratraqueal virus de la influenza A/Indonesia/5/05 (H5N1) o A/Netherlands/602/2009 (H1N1) | X | X | S, B | S, B | S, B | S, B |
| 2 | 9 | Profilaxis Interferón Beta | | | IFNβ | | | | | | | |
| 3 | 9 | Terapia Interferón Beta | | | X | | | | | | | |
| ALOJAMIENTO | | | Estándar (grupo) | ISOLATOR | | | | | | | | |

* animales seronegativos para influenza serán puesto en las instalaciones de animales (alojamiento estándar)
 * B= sangre entera para el suero; S = hisopos nasales/garganta ; LT = Tejido pulmonar después del sacrificio ; TS = Implantación del sensor de tiempo; W = peso corporal

Debido a que el número de animales incluidos en el estudio se utilizó un diseño de bloques. El estudio se realizó en tres bloques, con cada bloque que consta de nueve animales, tres animales de cada grupo de tratamiento.

5 Catorce días antes de la exposición al virus, nueve cynomolgus macaques confirmados como seronegativos para el virus de la influenza circulante se equiparon con un sensor de temperatura previamente programada en la cavidad abdominal y la sangre se recolectó bajo anestesia con ketamina y dormitor.

En el día 1, después de la recuperación total de la cirugía, todos los animales se anestesian, se pesan y se recolectan las muestras (sangre entera para el suero e hisopos nasales/garganta). Los animales pertenecientes a los grupos 1 y 2 se administran con placebo nebulizado o IFN- β (a la dosis determinada en la etapa 1) bajo anestesia.

10 En el día 0 los animales del grupo 1 y 2 se tratan con placebo nebulizado o IFN- β como se describe anteriormente. Todos los animales son desafiados por vía intratraqueal con virus de la influenza (10^5 TCID₅₀ H5N1 o 10^7 TCID₅₀ H1N1). Cuatro horas después los animales de desafío intratraqueal del Grupo 3 se administran con IFN- β nebulizado como se describe anteriormente.

En los días 1, 2, 3 y 4 todos los animales se anestesiaron, se pesaron, se recolectaron las muestras (sangre entera para el suero e hisopos nasales/garganta) y se trataron con placebo nebulizado o IFN- β como se describe anteriormente.

15 Cinco días después de la exposición todos los animales se anestesiaron, se pesaron y se sacrificaron mediante exanguinación. Se lleva a cabo la patología macroscópica completa, todos los órganos importantes inspeccionados y lesiones pulmonares descritas. Las muestras recolectadas de todos los animales, incluyendo: sangre entera de suero, hisopos nasales/garganta y tejido del pulmón derecho. Los hisopos recogidos durante el experimento y las secciones del pulmón derecho se someten a PCR cuantitativa y titulación de virus para determinar la carga viral. El pulmón izquierdo se infla con 10% de formalina para la evaluación histopatológica posterior.

20 Los principales criterios de valoración son la carga viral en los pulmones y la puntuación de la patología pulmonar. El frotis de garganta tomado diariamente dará una indicación de la evolución de la infección viral. Los datos positivos, una reducción de la carga viral en el pulmón o de la patología pulmonar, en particular después del tratamiento terapéutico con IFN- β , apoyarían el desarrollo de IFN- β inhalado para el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias inferiores causada por la influenza.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE SOUTHAMPTON

<120> TERAPIA ANTIVIRUS PARA ENFERMEDAD RESPIRATORIA

<130> JCI.P53241WO

30 <160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 757

<212> ADN

35 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (64) .. (564)

<400> 1

```

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctccac tacagctctt      60

tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga agc agc aat ttt      108
  Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
    1             5             10             15

cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tat tgc      156
Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
             20             25             30

ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag att aag cag ctg      204
Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
             35             40             45

cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc tat gag atg ctc      252
Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
             50             55             60

cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct agc act ggc tgg      300
Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
    65             70             75

aat gag act att gtt gag aac otc ctg gct aat gtc tat cat cag ata      348
Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
    80             85             90             95

aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttt      396
Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
             100             105             110

acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg      444
Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
             115             120             125

agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt cac tgt gcc tgg      492
Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
             130             135             140

acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac ttc att aac aga      540
Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
             145             150             155

ctt aca ggt tac ctc cga aac tga agatctccta gctgtcctt ctgggactgg      594
Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
    160             165

acaattgctt caagcattct tcaaccagca gatgctgttt aagtgactga tggctaattg      654

actgcaaatg aaaggacact agaagatfff gaaattfita ttaaattatg agttatfitt      714

atfatafita atfatafitt ggaaataaa ttafittfigg tgc      757

```

<210> 2

<211> 166

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1          5          10          15

Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
          20          25          30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
          35          40          45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
          50          55          60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65          70          75          80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
          85          90          95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
          100          105          110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
          115          120          125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130          135          140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145          150          155          160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
          165
    
```

<210> 3

<211> 720

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> interferon beta-1b

10 <220>

<221> CDS

<222> (64) .. (564)

<400> 3

```

atgaccaaca agtgtctcct ccaaattgct ctctgttgt gcttctcac tacagctctt      60

tcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga agc agc aat ttt      108
  Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
    1             5             10             15

cag agt cag aag ctg ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tat tgc      156
  Gln Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys

                20                25                30

ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag att aag cag ctg      204
  Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
                35                40                45

cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc tat gag atg ctc      252
  Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
                50                55                60

cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct agc act ggc tgg      300
  Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
    65             70             75

aat gag act att gtt gag aac ctg ctg gct aat gtc tat cat cag ata      348
  Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
    80             85             90             95

aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttt      396
  Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
                100                105                110

acc agg gga aaa ctg atg agc agt ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg      444
  Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
                115                120                125

agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt cac tgt gcc tgg      492
  Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
    130             135             140

acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac ttc att aac aga      540
  Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
    145             150             155

ctt aca ggt tac ctg cga aac tga agatctccta gcctgtcoct ctgggactgg      594
  Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
    160             165

acaattgctt caagcattct tcaaccagca gatgctgttt aagtgactga tggctaattg      654

actgcaaatg aaaggacact agaagatctt gaaattttta ttaaattatg agttattttt      714

atztat                                             720

```

<210> 4

5 <211> 166

ES 2 592 528 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> Interferon beta-1b

<400> 4

```

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1          5          10          15

Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
          20          25          30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
          35          40          45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50          55          60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn

65          70          75          80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
          85          90          95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100          105          110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115          120          125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130          135          140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145          150          155          160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

```

Reivindicaciones

- 5 1. El interferón- β (IFN- β) para uso en el tratamiento de enfermedad de las vías respiratorias inferiores que se ha desarrollado durante o después de una enfermedad similar a la influenza (ILI) establecida, en donde dicho tratamiento es mediante administración de aerosol de dicho medicamento a las vías respiratorias inferiores; en donde ILI se define como (a) una fiebre $>37.8^{\circ}\text{C}$ más dos de los siguientes síntomas: dolor de cabeza, tos, dolor de garganta y mialgia y (b) influenza confirmada; en donde ILI establecida significa una enfermedad en la que los síntomas han sido evidentes durante al menos 48 horas; en donde la enfermedad de las vías respiratorias inferiores es causada por la influenza; y en donde el IFN- β se administra a las vías respiratorias inferiores por medio de aerosol al menos 48 horas después de que los síntomas de ILI se hacen evidentes.
- 10 2. IFN- β para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de: (a) IFN- β 1a humana (SEQ ID NO: 2); o (b) IFN- β 1b humano (SEQ ID NO: 4).
3. IFN- β para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en combinación con un inhibidor de la neuraminidasa.
4. IFN- β para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el inhibidor de la neuraminidasa es activo por vía tópica.
- 15 5. IFN- β para uso de acuerdo con la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el inhibidor de la neuraminidasa es zanamivir.
6. IFN- β para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el paciente sufre de asma y/o COPD.
7. IFN- β para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el paciente tiene más de 60 años.
- 20 8. Un producto para su uso en el tratamiento de una enfermedad de las vías respiratorias inferiores que se ha desarrollado durante o después de una enfermedad similar a la influenza (ILI) establecida, que comprende (i) IFN- β y (ii) un inhibidor de la neuraminidasa inhalado, para administración de aerosol simultánea, separada o secuencial a las vías respiratorias inferiores; en donde ILI se define como (a) una fiebre $>37.8^{\circ}\text{C}$ más dos de los siguientes síntomas: dolor de cabeza, tos, dolor de garganta y mialgia y/o (b) influenza confirmada; en donde ILI establecida significa una enfermedad en la que los síntomas han sido evidentes durante al menos 48 horas; en donde la enfermedad de las vías respiratorias inferiores es causada por la influenza; y en donde el IFN- β es administrado a las vías respiratorias inferiores por medio de aerosol al menos 48 horas después de que los síntomas de ILI se hacen evidentes.
- 25

Figura 1a

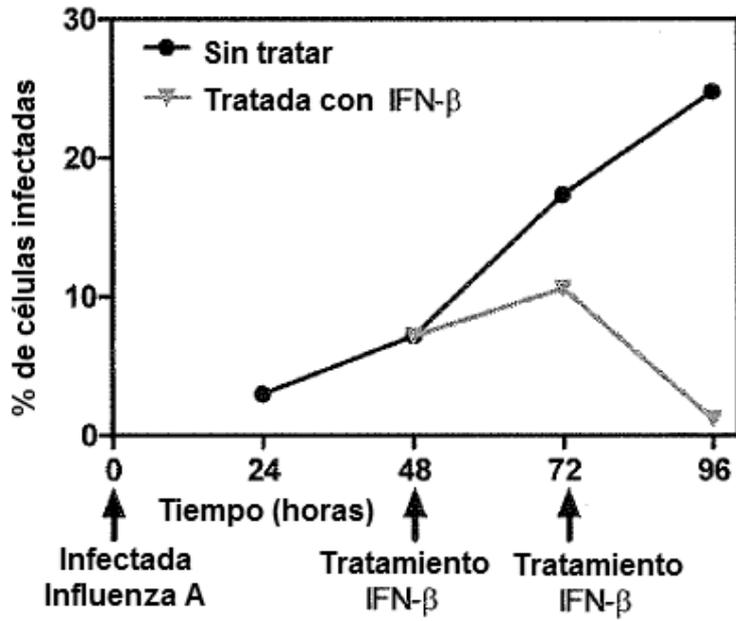
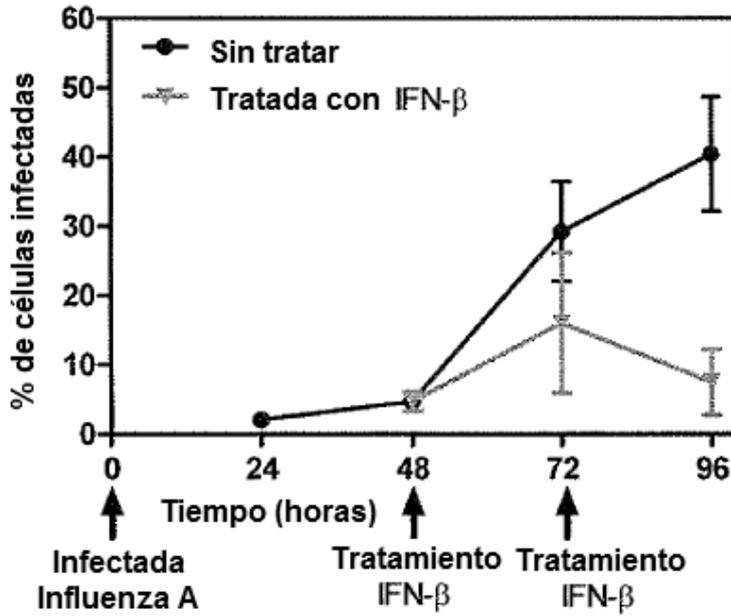


Figura 1b



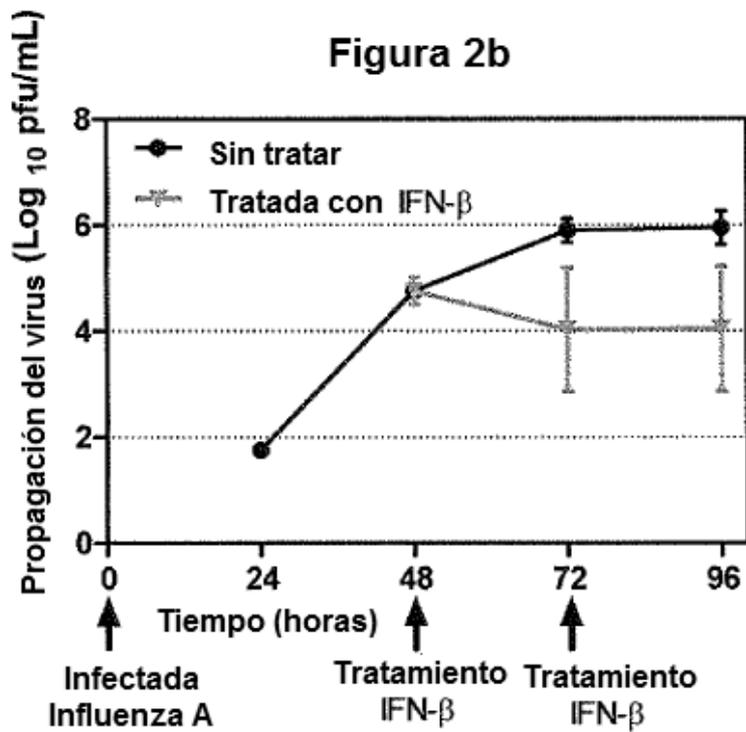
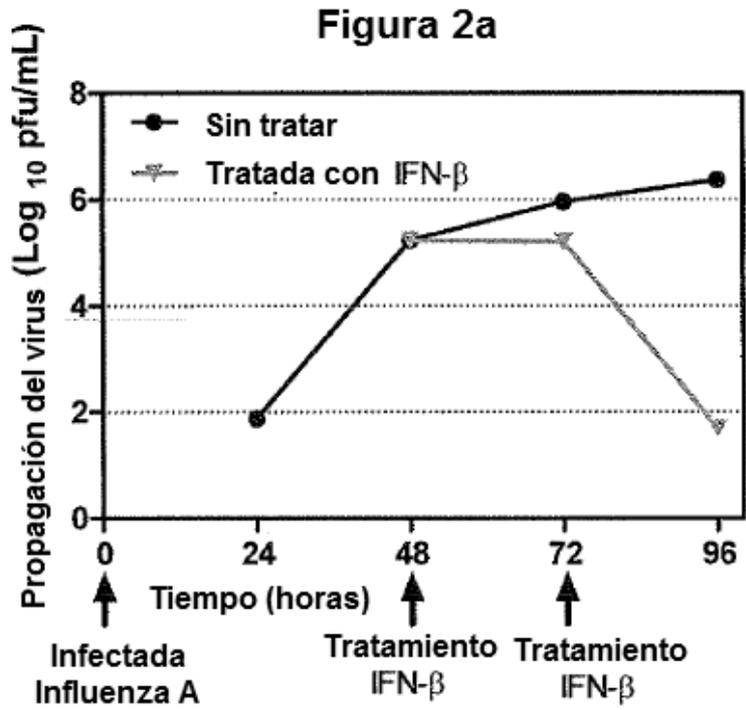


Figura 3

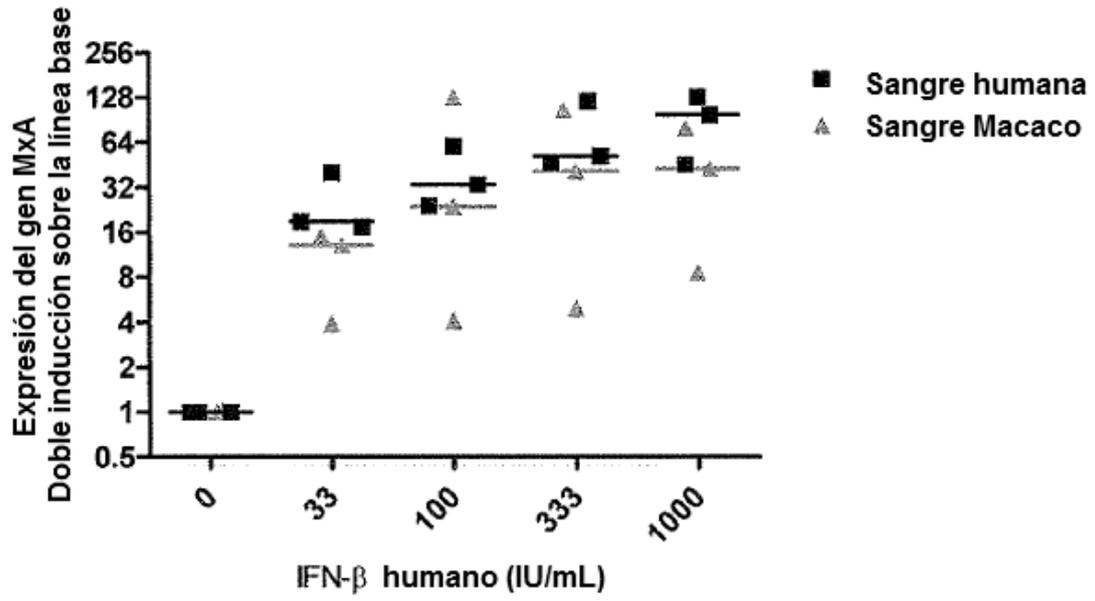


Figura 4

