

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 541**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2010 PCT/US2010/052527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO2011047065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2010 E 10824032 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2488205**

54 Título: **Proteína CC10 humana recombinante para el tratamiento de la gripe**

30 Prioridad:

**15.10.2009 US 252028 P**

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

**24.03.2017**

73 Titular/es:

**THERABRON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
9430 Key West Avenue Suite 150  
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**PILON, APRILE, L.;  
BORGÉAT, PIERRE PH., D. y  
FLAMAND, LOUIS PH., D.**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 606 541 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

Proteína CC10 humana recombinante para el tratamiento de la gripe

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud es una solicitud internacional PCT que reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/252.028, presentada el 15 de octubre de 2009.

10 **Campo de la invención**

Se dan a conocer métodos de reducción de títulos virales *in vivo* y de tratamiento de una infección respiratoria viral en un paciente, métodos de tratamiento de una infección por influenza, incluyendo influenza tipo A, particularmente influenza H1N1, y métodos de tratamiento de lo anterior usando CC10 humana recombinante administrada por vía intranasal y/o administrada por vía intravenosa y/o inhalada.

**Antecedentes**

La proteína de células de Clara de "10 kDa" (CC10) o uteroglobina (UG) es una pequeña proteína secretora heterodimérica producida por varios epitelios mucosos y otros órganos de origen epitelial (Mukherjee, 1999). CC10 consiste en dos subunidades idénticas de 70 residuos de aminoácido, cada una con el motivo estructural secundario de "haz tetrahelicoidal", unidas en orientación antiparalela por dos enlaces disulfuro entre Cys 3 y 69', 3' y 69 (Matthews, 1994; Morize, 1997). CC10 es el primer miembro de una familia emergente de pequeñas proteínas globulares que comparten la misma estructura secundaria, terciaria y cuaternaria y se cree que median en funciones similares. El homodímero que contiene dos enlaces disulfuro parece ser su forma primaria. En seres humanos, el pulmón es el sitio principal de producción de CC10, mientras que otros órganos varios sintetizan menores cantidades de ARNm que codifica para esta proteína (Singh, 1987; Sandmoller, 1994). CC10 es una proteína antiinflamatoria e inmunomoduladora que se ha caracterizado con respecto a diversas interacciones con otras proteínas, receptores y tipos de célula (revisado en Mukherjee, 1999 y Pilon, 2000). Se han encontrado menores niveles de proteína o ARNm de CC10 en diversas muestras de tejido y líquido para varios estados clínicos caracterizados por cierto grado de inflamación incluyendo la neumonía (Nomori, 1995).

Se ha estudiado la fisiología de la proteína CC10 en diferentes tipos de infecciones pulmonares en una cepa de ratón deficiente en CC10. En dos estudios en los que ratones deficientes en CC10 y de tipo natural se infectaron cada uno o bien con *Pseudomonas aeruginosa* o bien con adenovirus, dos patógenos respiratorios comunes en seres humanos, los ratones de tipo natural experimentaron una eliminación más rápida de los patógenos, con una mayor destrucción de los patógenos por el sistema inmunitario innato, lo que sugiere un beneficio para la deficiencia en CC10 durante una infección viral y bacteriana (Hayashida, 1999; Harrod, 1998). Esto concuerda con observaciones previas en las que se notificó que CC10 era un agente inmunosupresor (Dierynck, 1995; 1996), lo que indica que CC10 suprimiría la respuesta inmunitaria natural frente a una infección, ya sea bacteriana o viral, incluyendo influenza. Por tanto, no podía esperarse que la administración de CC10 en presencia de una infección respiratoria viral o bacteriana beneficiase al paciente. Posteriormente, se notificó que el restablecimiento de la función de CC10 usando proteína CC10 humana recombinante (rhCC10) antes de una infección con virus respiratorio sincitial (VRS), permitió una eliminación más rápida de la infección que en ratones deficientes no tratados (Wang, 2003). Sin embargo, un estudio reciente mostró que rhCC10 puede impedir el desarrollo de inmunidad adquirida, específicamente células T específicas de antígeno, cuando están presentes al mismo tiempo que se exponen células dendríticas al antígeno (Johansson, 2007), lo que indica de nuevo que la administración de rhCC10 puede no beneficiar a un paciente con una infección. Por tanto, el estado de conocimiento actual referente a los posibles peligros o beneficios del tratamiento con rhCC10 durante una infección respiratoria es contradictorio y no permite que se saquen conclusiones referentes al uso seguro y/o eficaz de CC10 para tratar diferentes tipos de infecciones respiratorias. No se dispone de información referente al efecto de CC10 sobre una infección por influenza. Se notifica en el presente documento la verificación directa de la eficacia de rhCC10 frente a influenza tipo A *in vivo*, la verificación directa de los efectos antivirales de CC10 a nivel celular, su mecanismo de acción, y su posible uso para tratar y/o prevenir una infección viral, y, en particular, infección por influenza.

Influenza ha provocado cuatro brotes importantes (1889, 1918, 1957 y 1968) en los últimos 120 años, provocando la muerte de una estimación de 50-100 millones de personas en todo el mundo. Influenza es un ortomixovirus, un virus de ARN que se transmite por aerosoles así como por contacto directo de superficies contaminadas con la mucosa nasal y selecciona como diana las células epiteliales respiratorias. La infección por influenza puede provocar síntomas intensos, incluyendo fiebre, dolor de garganta y dolores musculares, malestar, pérdida de peso, congestión respiratoria y, a veces, insuficiencia respiratoria y muerte. Influenza produce una respuesta inmunitaria adquirida (células T citotóxicas y anticuerpos) que elimina normalmente la infección en 1-2 semanas en individuos sanos normales. Varios subtipos de influenza que infectan a seres humanos, incluyendo influenza aviar (H5N1), influenza estacional (H3N2) y gripe porcina (H1N1), pueden tratarse con agentes antivirales tales como inhibidores de neuraminidasa. Sin embargo, la rápida tasa de mutación en influenza ha conducido al desarrollo de cepas resistentes a fármacos (Moscona, 2009), de manera que el uso extendido de agentes antivirales para la prevención

y/o el tratamiento conducirá a la aceleración del desarrollo de resistencia a estos fármacos. Por tanto, son necesarios nuevos agentes terapéuticos para tratar, curar y prevenir una infección por influenza. Asimismo, no hay terapias aprobadas para la amplia mayoría de infecciones virales en las vías respiratorias y otros sistemas corporales.

5 **Objetos de la invención**

Lo anterior proporciona una lista no exclusiva de los objetivos logrados por realizaciones de la presente invención.

10 Es un objeto de realizaciones de la invención reducir el título viral pulmonar y de ese modo tratar, curar o prevenir una infección por influenza, especialmente una infección por influenza tipo A, y más especialmente una infección por influenza cepa H1N1.

15 Es un objeto adicional de realizaciones de la invención reducir el título viral pulmonar y tratar, curar o prevenir una infección por influenza administrando CC10 por vía intravenosa, vía inhalada o vía intranasal (según la PCT de 2009), o mediante una combinación de vías.

20 Es otro objeto de realizaciones de la invención reducir el título viral y tratar, curar o prevenir una infección viral administrando CC10 por vía intravenosa, vía inhalada o vía intranasal, vía oral, vía intravaginal, o mediante una combinación de vías. Es aún otro objeto de realizaciones de la invención inhibir la replicación viral a nivel celular usando CC10 u otros miembros de la familia de las secretoglobinas.

### Sumario de la invención

25 Estos y otros objetos, características y ventajas se logran mediante realizaciones de la invención tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

30 En particular, la presente invención se refiere a uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso en un método de tratamiento para reducir el título de virus influenza en el tejido pulmonar de un paciente. En determinados aspectos, se administra uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante.

35 Estos y otros objetos, características y ventajas también se logran mediante realizaciones de la invención administrando uteroglobina (CC10) en un intervalo de dosificación dado a intervalos apropiados o en una dosis cuando se le diagnostica a un paciente una infección por influenza mediante síntomas de fiebre, mialgia y congestión, y/o mediante la detección de virus influenza en muestras del paciente (lavados nasales, muestras de sangre o esputo) a través del cultivo del virus, detección inmunológica del virus, y/o detección del ácido nucleico viral, usando métodos convencionales.

40 En determinados aspectos de la invención, se administra uteroglobina (CC10) por vía intranasal en una dosis dividida de manera aproximadamente equitativa entre cada narina en un intervalo de 1,5 microgramos a 1,5 miligramos por kilogramo de peso corporal al día, o en múltiples dosis que tomadas conjuntamente logran este intervalo de dosificación diariamente para reducir el título viral pulmonar y tratar, curar o prevenir una infección por influenza.

45 En otro aspecto, se administra uteroglobina (CC10) por vía intravenosa en una dosis de hasta 10 miligramos por kilogramo de peso corporal al día, o en múltiples dosis que tomadas conjuntamente logran este intervalo de dosificación diariamente para tratar, curar o prevenir una infección por influenza.

50 En otro aspecto, se administra una proteína CC10 no humana en un intervalo de dosificación dado a intervalos apropiados o en una dosis cuando se le diagnostica a un paciente una infección viral mediante síntomas característicos del virus particular, y/o mediante la detección de virus en muestras del paciente a través del cultivo del virus, detección inmunológica del virus, y/o detección del ácido nucleico viral, usando métodos convencionales.

### Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 es un gráfico de barras que representa la carga de virus H1N1 a los 2 días en pulmones de ratas algodóneras infectadas tratadas con rhCC10 intranasal. Se expresa el título viral como  $(x 10^7)$  TCID<sub>50</sub>/gramo de tejido.

60 La figura 2 es un gráfico de barras que representa la carga de virus H1N1 a los 2 días en pulmones de ratas algodóneras tratadas con inyección intraperitoneal de rhCC10. Se expresa el título viral como  $(x 10^7)$  TCID<sub>50</sub>/gramo de tejido.

65 La figura 3 es un gráfico de barras que representa la inhibición de la replicación viral en células en cultivo por rhCC10. Se añadió RHCC10 al medio de cultivo de células HEp2 a 100 microgramos/ml, 300 microgramos/ml y 1 miligramo/ml y se dejó durante 4 horas. Luego se retiró el medio y se repuso y se infectaron las células con VRS

durante 1 hora. Luego se lavaron las células para retirar el virus en exceso y se añadió de vuelta rhCC10 y se incubó durante otra hora. Luego se lavaron las células para retirar CC10 en exceso. Se midieron los títulos virales en medio de cultivo a los 4 días tras la infección. Se realizó cada concentración de CC10 por triplicado.

5 La figura 4 es una comparación de gráfico de barras de los efectos antivirales de rhCC10 cuando se administró antes de la infección y tras la infección. Se trataron células HEp2 con 1 mg/ml de rhCC10 y se infectaron con VRS como en la figura 3. Además, se administró 1 mg/ml de rhCC10 una hora después de la infección (tratamiento D0), 24 horas después de la infección (tratamiento D1), y 48 horas después de la infección (tratamiento D2). Se midieron los títulos virales en medios de cultivo el día 4 tras la infección.

10

### Descripción detallada

Realizaciones de la presente invención se refieren al uso de CC10 para reducir el título viral pulmonar y tratar, curar o prevenir una infección por influenza. La CC10 es preferiblemente una proteína CC10 humana recombinante (rhCC10) obtenida mediante los procesos descritos en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030207795 emitida como patente estadounidense n.º 7.122.344 y el documento PCT/US09/43613 publicado como WO 2009/140269 A2, o mediante cualquier otro proceso que produzca rhCC10 de calidad farmacéutica. La rhCC10 de las realizaciones de la presente invención puede administrarse con, sin, antes o después de la otra terapia intranasal, pulmonar o sistémica.

15

20

Sin limitar el alcance de posibles procesos de síntesis que pueden usarse para producir la CC10 humana, la CC10 humana recombinante (también conocida como uteroglobina) que es activa en la supresión de la replicación viral *in vitro* e *in vivo* se sintetizó y caracterizó tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030207795 emitida como patente estadounidense n.º 7.122.344.

25

Preparaciones de rhCC10 para administración intranasal tal como se describe en el documento PCT/US09/43613 publicado como WO 2009/140269 A2 representan realizaciones adicionales de la presente invención que pueden usarse para suprimir la replicación viral *in vivo*, particularmente en las fosas y los senos nasales.

30

### Dosificaciones

Preferiblemente, en el tratamiento o la prevención de una infección por influenza, se administra rhCC10 por vía intranasal, a cada narina 1-3 veces al día, durante 7-14 días, y cada dos días después de eso durante otros 14 días, y después de eso según sea necesario. Más preferiblemente, se administra rhCC10 tan pronto como el paciente empieza a experimentar fiebre, mialgia y congestión o se le diagnostica gripe.

35

La rhCC10 puede producirse en un proceso de producción de una uteroglobina humana recombinante de calidad farmacéutica tal como se describe en el párrafo 31 de la patente estadounidense n.º 7.122.344, que comprende las etapas de: a) proporcionar un sistema de expresión bacteriano que puede expresar rhCC10; b) inocular un fermentador con un inóculo que comprende el sistema de expresión bacteriano para formar un cultivo de fermentación; c) añadir un agente de inducción al cultivo de fermentación para inducir la expresión de rhCC10 por el sistema de expresión bacteriano; d) recoger la rhCC10 expresada en la etapa c; y e) purificar la rhCC10 recogida en la etapa d, en el que la etapa de purificación comprende el uso de al menos un filtro y al menos una columna de intercambio iónico. La rhCC10 también puede expresarse en sistemas de expresión bacterianos, fúngicos, de insectos, de mamíferos o de plantas alternativos y purificarse para cumplir las especificaciones para un producto farmacéutico adecuado para la administración a seres humanos usando métodos convencionales.

40

45

Las especificaciones y resultados de prueba para la rhCC10 de calidad farmacéutica, según la tabla 20 de la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030207795 emitida como patente estadounidense n.º 7.122.344, que pueden usarse para reducir los títulos virales incluyen los siguientes:

50

| <u>Prueba</u>       | <u>Especificación</u> |
|---------------------|-----------------------|
| Color               | Claro, incoloro       |
| Aspecto             | Sin turbidez          |
| Homogeneidad        | Homogéneo             |
| Pureza              | ≥ 95%                 |
| Agregación          | ≥ 5%                  |
| Esterilidad         | Estéril               |
| Actividad biológica | Positiva              |

|                           |               |
|---------------------------|---------------|
| Ácido nucleico bacteriano | <100 pg/dosis |
| Espectroscopía de masas   | Ap. 16110     |
| pH                        | 5-8           |
| Isoelectroenfoco          | Ap. 4,7       |
| Tiol libre                | <10% (p/p)    |
| LAL                       | <5 UE/mg      |
| Cobre                     | <16 µM        |

En una realización adicional, la rhCC10 de la presente invención que inhibe la replicación viral también inhibe las enzimas fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030207795 emitida como patente estadounidense n.º 7.122.344.

5 Para efectuar los resultados deseados que se describen adicionalmente a continuación, se hace referencia a métodos de administración descritos en las siguientes realizaciones.

10 En una realización, pueden administrarse una dosis o múltiples dosis de rhCC10 intranasal que equivalen a una dosis que oscila entre aproximadamente 1,5 microgramos y aproximadamente 5 miligramos por kilogramo de peso corporal al día. En otra realización, puede administrarse rhCC10 en el intervalo de dosis diariamente. En aún otra realización, puede administrarse rhCC10 en el intervalo de dosis diariamente durante al menos siete días de manera consecutiva. En todavía una realización adicional, puede administrarse rhCC10 en el intervalo de dosis diariamente durante al menos 14 días de manera consecutiva. En todavía otra realización, puede administrarse rhCC10 en el intervalo de dosis cada dos días durante 30 días de manera consecutiva. En aún otra realización, puede administrarse rhCC10 en dosificaciones decrecientes diariamente durante diez días consecutivos, comprendiendo dichas dosificaciones decrecientes una alta dosis en cada administración durante los tres primeros días, una dosis intermedia en cada administración durante los tres segundos días, y una dosis baja en cada administración durante los últimos cuatro días. En aún todavía otra realización, puede administrarse rhCC10 en el intervalo de dosis o en dosis decrecientes hasta tres veces al día, aproximadamente cada ocho horas.

15 En otra realización, pueden administrarse las dosis anteriores de rhCC10 por vía intranasal al paciente como un aerosol, mediante pulverización o lavado intranasal, o mediante deposición de un gel o una crema, u otro método de instilación en las fosas nasales.

25 En otra realización, pueden administrarse las dosis anteriores de rhCC10 mediante inhalación al paciente como un aerosol, mediante nebulizador o inhalador de dosis medidas, u otro método de aplicación directa a los pulmones y las vías respiratorias.

30 En otra realización, en el tratamiento o la prevención de una infección por influenza, se administra rhCC10 por vía intravenosa, en dosis de 15 microgramos a 20 miligramos por kilogramo de peso corporal, 1-3 veces al día, durante 7-14 días, y cada dos días después de eso durante otros 14 días, y después de eso según sea necesario. En aún otra realización, puede administrarse rhCC10 en dosificaciones decrecientes diariamente durante diez días consecutivos, comprendiendo dichas dosificaciones decrecientes una alta dosis en cada administración durante los tres primeros días, una dosis intermedia en cada administración durante los tres segundos días, y una dosis baja en cada administración durante los últimos cuatro días. En aún todavía otra realización, puede administrarse rhCC10 en el intervalo de dosis o en dosis decrecientes hasta tres veces al día, aproximadamente cada ocho horas.

40 En otra realización, pueden administrarse las dosis anteriores de rhCC10 al paciente usando una combinación de vías intranasal, inhalada e intravenosa. En una realización adicional, puede administrarse rhCC10, según los métodos descritos anteriormente, antes de, durante o después de la terapia antiviral, terapia con antibióticos, descongestionantes, antihistamínicos, mucolíticos, expectorantes, supresores de mucosidad, surfactantes, broncodilatadores, vasoconstrictores, analgésicos para el dolor sinusal, u otra terapia típica. En todavía otra realización, puede administrarse rhCC10, según los métodos descritos anteriormente, para reducir el título viral pulmonar y tratar, curar o prevenir una infección por influenza.

45 Las dosis de rhCC10 y los métodos de aplicación descritos anteriormente pueden administrarse diariamente, más de una vez al día, tres veces al día, cada dos días o de modo decreciente dependiendo de la gravedad de la infección por influenza que esté tratándose, la salud general del paciente, y si están presentes estados subyacentes. Por ejemplo, cuanto más grave sea la infección, mayor será la cantidad de rhCC10 que se requerirá para tratarla de forma eficaz. Se entiende que un médico podrá monitorizar y ajustar las dosis, formulaciones y los métodos de aplicación según sea necesario basándose en los síntomas y las respuestas del paciente a la terapia y dentro de los parámetros e intervalos de dosis descritos en las realizaciones de la presente invención.

Formulaciones

Se han descrito formulaciones intranasales, dispositivos y métodos mediante los que pueden administrarse rhCC10 por vía intranasal en el documento PCT/US09/43613, publicado como WO2009/140269A2, que se incorporó en su totalidad al texto de la presente solicitud PCT tal como se presentó originariamente. La formulación intravenosa de rhCC10 consiste en una disolución de 5,5 mg/ml en solución salina al 0,9% y se ha descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20030207795, emitida como la patente estadounidense n.º 7.122.344, que se incorporó en su totalidad al texto de la presente solicitud PCT tal como se presentó originariamente.

**Ejemplo 1**Propagación y determinación del título de virus influenza

Se prepara la cepa de virus influenza A (H1N1) A/PR/8/34, adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, Virginia, EE.UU.). Se propaga el virus influenza en células MDCK (n.º de catálogo ATCC CCL-34) mediante la infección de una monocapa celular confluyente al 60% (matraces de 150 cm<sup>2</sup>) con el virus de la gripe a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. De tres a cuatro días después, cuando el efecto citopático es generalizado y la mayor parte de las células se han desprendido del recipiente de cultivo, se recogen las células y los sobrenadantes. Se retiran las células mediante centrifugación (800 g) y se filtra el sobrenadante (0,45 µm) y se centrifuga (18000 g) durante 2 horas a 4°C para sedimentar los virus. Se resuspende el sedimento viral en medio DMEM, se toman alícuotas y se almacenan a -150°C. Se determina el título de virus influenza aplicando 0,1 ml de reservas virales diluidas en serie a monocapas de células MDCK en una placa de 96 pocillos cultivada en presencia de tripsina y albúmina sérica bovina al 0,1%. Tres días después, se puntúan los efectos citopáticos y se determina la dosis infecciosa en cultivo tisular al 50% (TCID<sub>50</sub>) usando el método de Kärber.

Procesamiento de tejidos pulmonares para el análisis de la carga viral.

Se extirpan de manera aséptica secciones de los lóbulos izquierdo y derecho de ratas algodoneras y ratones infectados, se pesan y se homogeneizan en 1 ml de medio DMEM durante 45 segundos usando un aparato de desgarrado de tejidos (modelo n.º 985-370, Biopspec Products Inc.) a un ajuste de 5. Se centrifugan los homogeneizados a 3000 g durante 20 minutos. Se recogen los sobrenadantes clarificados, y se almacenan congelados a -150°C hasta que se usen.

Determinación de títulos virales.

Se determinaron los títulos virales en reservas virales amplificadas y en homogeneizados pulmonares mediante dilución en serie seguido por un ensayo de formación de placas (EFP) o ensayo de formación de focos (EFF). Se calcularon las unidades formadoras de placas (UFP) y las unidades formadoras de focos (UFF) por mililitro de muestra original antes del inicio del estudio. Se almacenó un conjunto de muestras de influenza suficientes para llevar a cabo los EFP y EFF y se determinaron las UFP y UFF después de completarse los estudios. Se prepararon diluciones en serie de virus cultivados en medios clarificados (DMEM con BSA al 1%) a lo largo del intervalo de dilución de 10<sup>1</sup> a 10<sup>8</sup>. Se evaluó cada dilución mediante un ensayo de formación de placas (EFP) y un ensayo de formación de focos (EFF). Los títulos de cultivo producen normalmente 10<sup>7</sup> - 10<sup>9</sup> ufp/ml para influenza.

**Ejemplo 2**Administración intranasal de rhCC10 para reducir el título pulmonar de virus influenza

La rata algodонера (*S. hispidus*), un tipo de pequeño roedor, es un modelo animal en el que se replica influenza y genera una infección respiratoria leve (Ottolini, 2005). Se infectan los animales mediante inoculación intranasal con virus influenza y los títulos virales pulmonares alcanzan un máximo dos días (aproximadamente 48 horas) después de la inoculación. Se usa este modelo para seleccionar compuestos que inhiban la replicación de influenza *in vivo*.

Se adquirieron ratas algodoneras libres de patógenos de Virion Systems, Inc. (Rockville, MD). Se infectaron un total de dieciocho ratas algodoneras (*S. hispidus*, de 6-8 semanas de edad) con influenza tipo A (A/PR/8/34), cepa H1N1, mediante inoculación intranasal usando 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> en un volumen de 0,1 ml para cada rata. Seis animales recibieron un placebo (NaCl al 0,9%), seis animales recibieron 0,5 mg/kg de rhCC10 y seis animales recibieron 5,0 mg/kg de rhCC10 mediante instilación intranasal 2 horas antes de la inoculación viral. Se sacrificaron los animales el día 2 tras la infección cuando los títulos virales son normalmente los más altos y se determinó la carga viral en tejido pulmonar. La figura 1 ilustra las reducciones del título viral en tejido pulmonar que se observaron en los dos grupos de dosis de rhCC10. El título viral en pulmón se expresa como (x 10<sup>7</sup>) TCID<sub>50</sub>/gramo de tejido.

**Ejemplo 3**Administración sistémica de rhCC10 para reducir el título pulmonar de virus influenza

- Se infectaron un total de dieciocho ratas aldoneras (*S. hispidus*, de 6-8 semanas de edad) con influenza tipo A (A/PR/8/34), cepa H1N1, mediante inoculación intranasal usando  $10^7$  TCID<sub>50</sub> en un volumen de 0,1 ml para cada rata. Seis animales recibieron un placebo de solución salina, seis animales recibieron 0,5 mg/kg de rhCC10 y seis animales recibieron 5,0 mg/kg de rhCC10 mediante inyección intraperitoneal (i.p.). La vía i.p. da como resultado cantidades significativas de rhCC10 circulante y simula la vía intravenosa de administración en seres humanos. Cada animal recibió un total de seis dosis de o bien placebo o bien rhCC10 aproximadamente cada 12 horas, incluyendo dos dosis (por la mañana y por la noche) el día antes de la infección, dos dosis el día de la infección, y dos dosis el día después de la infección (3 dosis antes de la infección, 3 dosis después de la infección). Se sacrificaron los animales el día 2 tras la infección cuando los títulos virales son normalmente los más altos y se determinó la carga viral en tejido pulmonar. La figura 2 ilustra la reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ) del título viral en tejido pulmonar que se observó en el grupo de dosis de 5 mg/kg de rhCC10, y la tendencia hacia un menor título viral en el grupo de dosis de 0,5 mg/kg. El título viral en pulmón se expresa como ( $\times 10^7$ ) TCID<sub>50</sub>/gramo de tejido.
- Basándose en lo anterior, se ha encontrado que rhCC10 reduce el título viral en una infección respiratoria, lo que indica el uso de rhCC10 para tratar, curar y/o prevenir una infección por influenza. Por consiguiente, realizaciones de la presente invención proporcionan una terapia basada en rhCC10 intranasal e intravenosa, o una combinación eficaz en el tratamiento, la curación o prevención de una infección por influenza.

#### 20 Ejemplo 4

##### Inhibición mediada por CC10 de la replicación viral a nivel celular

- Se usaron células HEp2 (ATCC, Manassas, VA) para propagar VRS, cepa A-2 (Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD) y generar reservas virales. Se sembraron en placa las células a 50.000 células/pocillo en placas de 48 pocillos y se hicieron crecer en MEM con FBS al 10% hasta ~80% de confluencia. Se pretrataron las células con CC10 en 0,5 ml de MEM durante 4 horas. Luego se cambió el medio y se realizaron infecciones con VRS usando  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> por placa TC de 100 mm durante 1 hora. Se retiró el virus no adsorbido mediante lavado y se añadieron 0,5 ml de MEM con FBS al 2%, L-glutamina 4 mM y rhCC10. Se recogieron los sobrenadantes el día 4 tras la infección y se tituló el virus. La figura 3 muestra que una concentración de 1 mg/ml de CC10 eliminó prácticamente la producción de VRS, mientras que 100 y 300 microgramos/ml mostraron una disminución de ~3 veces.

- CC10 también inhibió la replicación viral en células cuando se administró a las 1, 24, y 48 horas después de la infección. La figura 4 muestra que rhCC10 es eficaz en la reducción del título viral no sólo cuando se añadió antes de la infección, sino también cuando se añadió después de la infección. Este es el primer informe de una actividad antiviral directa de CC10 a nivel celular e ilustra la posible utilidad de rhCC10 como terapia antiviral para el tratamiento tras la exposición.

#### 40 Ejemplo 5

##### Mecanismo de acción antiviral de CC10

- El fenotipo de células epiteliales de vías respiratorias en el ratón deficiente en CC10 ilustra que en ausencia de CC10, la distribución de orgánulos intracelulares es anómala, que están presentes estructuras membranosas apiladas anómalas, y que se perturba la secreción de otras proteínas producidas por la célula. Se supone que este fenotipo significa que CC10 desempeña un papel activo en el transporte de vesículas secretoras desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática de la célula. CC10 también modula la captación y el procesamiento de antígenos en células presentadoras de antígeno. Se interpreta que estas observaciones significan que CC10 es un importante factor en el transporte de materiales tanto al exterior como al interior en muchos tipos de células. Por tanto, se deduce que CC10 inhibe la replicación viral mediante interferencia en el transporte viral en la célula. Puesto que todos los virus se basan en procesos de transporte celular para invadir la célula y replicarse, puede esperarse que CC10 inhiba la replicación de todos los virus. Asimismo, también puede esperarse que otras secretoglobinas, que comparten una estructura similar a la de CC10, inhiban la replicación viral a nivel celular. De manera similar, también puede esperarse que péptidos derivados de CC10 y otras secretoglobinas que modulan procesos de transporte celular inhiban la replicación viral.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso en un método de tratamiento para reducir el título de virus influenza en el tejido pulmonar de un paciente.
2. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso según la reivindicación 1, en la que la uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante trata, cura o previene una infección por influenza en el paciente.
- 10 3. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso según la reivindicación 1, en la que influenza es influenza tipo A.
4. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso según la reivindicación 1, en la que influenza es la cepa H1N1 de influenza.
- 15 5. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso según la reivindicación 1, en la que se administra la uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante por vía intranasal, vía intravenosa o una combinación de vías intranasal e intravenosa.
- 20 6. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso según la reivindicación 1, en la que la uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante inhibe la replicación viral a nivel celular.
7. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso según la reivindicación 6, en la que se administra la uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante a un paciente infectado.
- 25 8. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso según la reivindicación 6, en la que se administra la uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante a un animal infectado.
- 30 9. Uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante para su uso según la reivindicación 6, en la que se administra la uteroglobina humana o uteroglobina humana recombinante a una célula infectada.

Figura 1

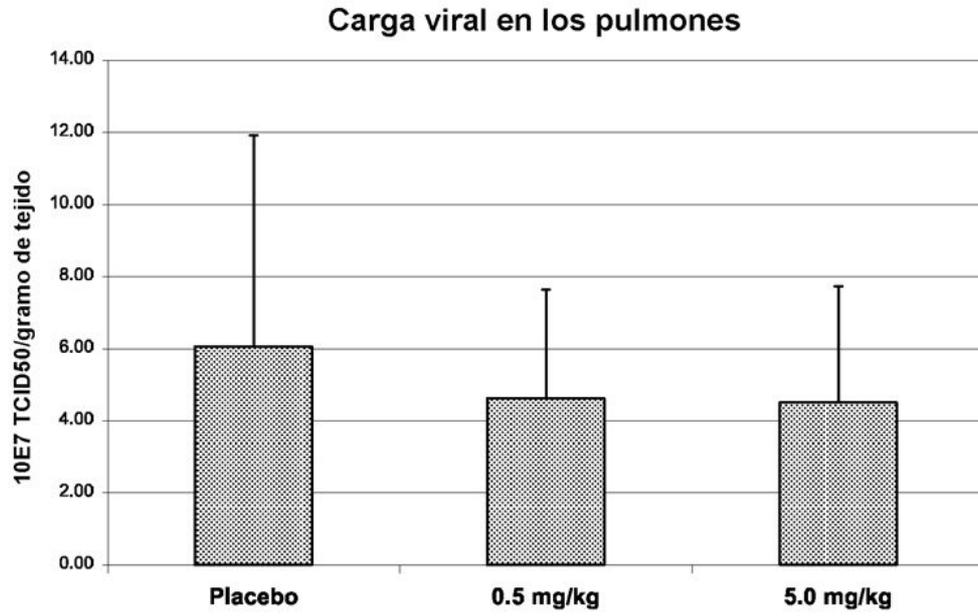


Figura 2

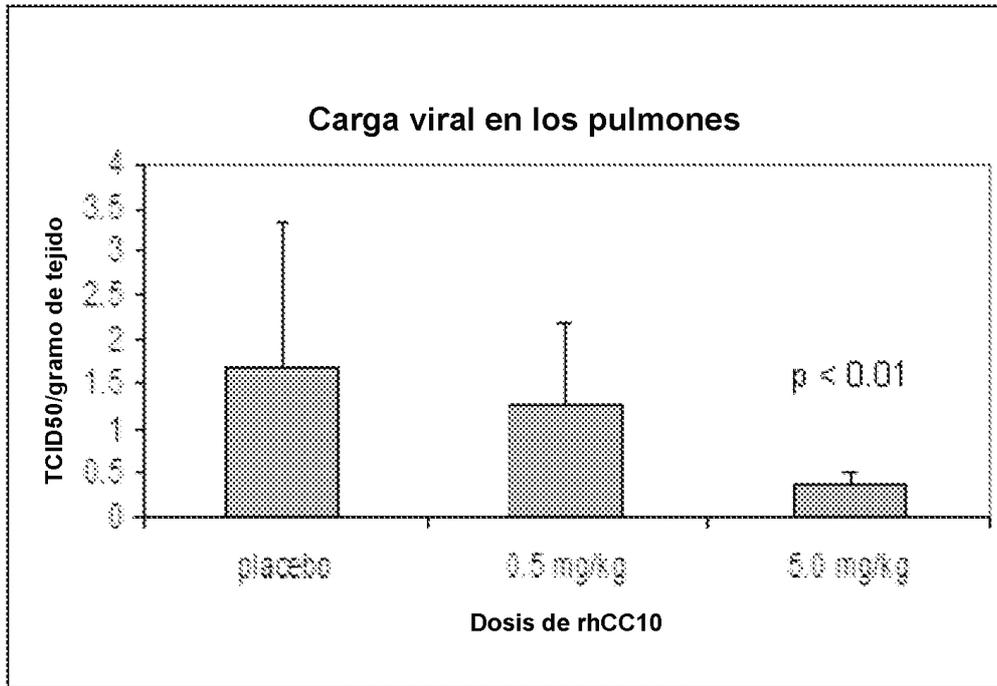


Figura 3

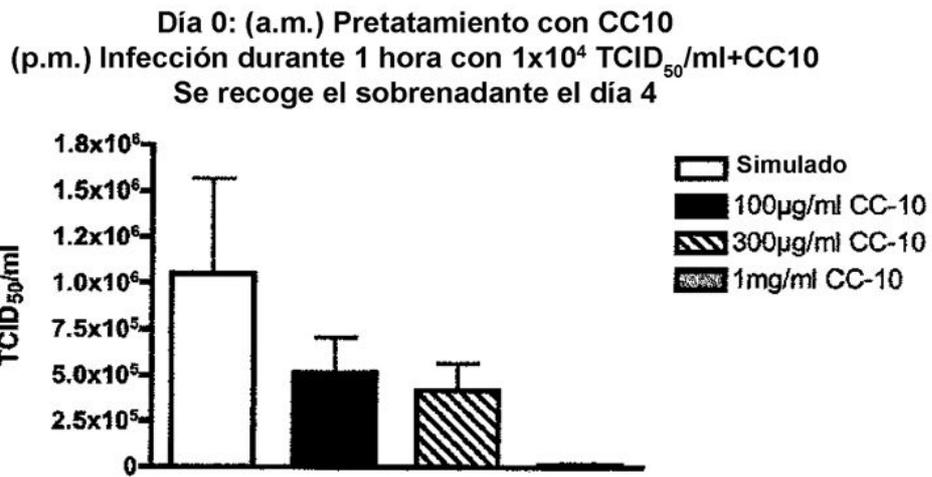


Figura 4

Día 0: Infección durante 1 hora con  $1 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml  
Se recoge el sobrenadante el día 4

