

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 674**

51 Int. Cl.:

A61K 31/722 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2013 PCT/PL2013/000064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13172725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2013 E 13729822 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2849763**

54 Título: **El uso de polímero de quitosano en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por coronavirus**

30 Prioridad:

18.05.2012 PL 39924612

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

21.02.2018

73 Titular/es:

**UNIWERSYTET JAGIELLONSKI (100.0%)
Ul. Golebia 24
31007 Krakow, PL**

72 Inventor/es:

**PYRC , KRZYSZTOF;
MILEWSKA, ALEKSANDRA;
NOWAKOWSKA, MARIA;
SZCZUBIALKA, KRZYSZTOF y
KAMINSKI , KAMIL**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 655 674 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

El uso de polímero de quitosano en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por coronavirus

5 La presente invención se refiere a los polímeros de quitosano para uso en el tratamiento de infecciones provocadas por coronavirus al inhibir su replicación. Los virus humanos que pertenecen a la familia Coronaviridae provocan infecciones respiratorias manifestadas mediante insuficiencia y deterioro de las funciones respiratorias correctas. Algunos coronavirus también pueden infectar muchas especies animales (que incluyen murciélagos, ratones, ratas, gatos, perros, conejos, caballos, ganado, pollos, pavos y aves silvestres), o que provoca un amplio rango de enfermedades, que afectan, entre otros, al sistema respiratorio, el tracto digestivo, hígado, sistema cardiovascular y sistema nervioso.

15 En particular, la invención incluye los polímeros de quitosano para uso en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio superior, infecciones del tracto respiratorio inferior, difteria, infecciones gastrointestinales, infecciones del sistema nervioso, infecciones del hígado, infecciones del sistema cardiovascular y enfermedad de Kawasaki en humanos y animales. Los coronavirus son virus con envoltura que tienen un genoma en forma de un ARN de hebra sencilla de sentido positivo. Inicialmente, la familia Coronaviridae se dividió en tres grupos con base en los métodos serológicos.

20 Después de la implementación de técnicas moleculares, esta familia de virus se reorganizó y en la actualidad consiste en alfa, beta, gamma y deltacoronavirus.

25 Los alfacoronavirus incluyen numerosos agentes patógenos de origen animal (por ejemplo, virus de peritonitis felina, virus de diarrea epidémica porcina) y dos coronavirus humanos (HCoV-229E y HCoV-NL63). Los betacoronavirus incluyen virus de animales, tales como virus de la hepatitis de ratón (MHV), coronavirus equino, coronavirus canino, y tres coronavirus humanos (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, y SARS-CoV). Los gamma y deltacoronavirus incluyen patógenos que infectan a aves y mamíferos marinos.

30 La técnica anterior conoce la capacidad del quitosano y sus derivados para unir virus e inhibir su replicación. Por ejemplo, se sabe que los derivados de azúcar de quitosano poseen la capacidad de unirse al virus de la gripe a través de la proteína hemaglutinina, que es la proteína típica del virus de la gripe capaz de unirse a residuos de azúcar (Li X. et al. (2011). *Biomacromolecules*, 12: 3962-3969; Kalashnikova I. et al. (2008). *Anal Chem* 80: 2188-2198, Makimura Y et al. (2006). *Carbohydr Res* 341: 1803-1808, U.S. 6,680,054].

35 Del mismo modo, el quitosano sin modificar en forma de microgránulos se utilizó para inhibir la replicación de la infección por enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV). Se ha mostrado que la administración de quitosano en forma de microgránulos a ratones lactantes resulta en la reducción de síntomas de la enfermedad (Li D. (2010) *Virology* 7: 125).

40 También se demostró que los derivados de quitosano sulfonados tienen actividad antiviral que inhibe la replicación del virus VIH-1, probablemente al bloquear la interacción entre la proteína viral gp120 y su receptor situado sobre la superficie de las células susceptibles (CD4) (Artan M. et al. (2010). *Carbohydr Res* 345: 656-662). Se reporta en la literatura que los derivados de ácido sulfónico de quitosano inhiben la replicación de otros retrovirus y miembros de la familia Herpesviridae (US 2009286757, US 2005209189, EP 0497988, DE 4242813 y C. Ishihara et al. (1993). *Vaccine* 11: 670-674). Del mismo modo, el quitosano de bajo peso molecular tiene actividad antiviral contra calicivirus felino y norovirus murino (Su X. et al. (2009). *J Food Prot* 72: 2623-2628). También existen solicitudes de patentes y patentes relacionadas con la actividad antiviral del quitosano y derivados de quitosano.

50 Sin embargo, el quitosano soluble, así como derivados de ácido sulfónico de quitosano, no muestran actividad contra los coronavirus. Del mismo modo, el uso de otros polímeros catiónicamente modificados no resultó en la inhibición de la replicación viral en condiciones in vitro. El polímero desarrollado, en contraste con aquellos descritos anteriormente, no mostró actividad contra otros virus humanos tales como metapneumovirus humano, enterovirus, virus de la gripe A y B, y virus del herpes humano tipo 1.

55 El documento WO2005/074947 A2 divulga una eficacia antiviral de la composición que consiste de un componente de metal iónico multivalente, un polímero catiónico, y un surfactante catiónico. Sin embargo, la invención citada no proporciona ninguna información sobre la actividad del quitosano de amina cuaternaria en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por los coronavirus.

60 El documento WO2008/105934 A2 se refiere al uso de quitosano y derivados en la inactivación de los coronavirus humanos. La solicitud descrita indica claramente que los derivados de quitosano están funcionalizados con aminoácidos, como por ejemplo quitosano-arginina o quitosano-guanidina. Por lo tanto, la invención mencionada difiere de la materia objeto de la presente solicitud en el compuesto de quitosano.

65 La publicación de LOUBAKI E ET AL: "Chemical modification of chitosan by glycidyl trimethylammonium chloride. characterization of modified chitosan by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy", *EUROPEAN POLYMER JOURNAL*,

PERGAMON PRESS LTD. OXFORD, GB, vol. 27, no. 3, 1 (1991-01-01) divulga un método de modificación química de quitosano mediante cloruro de glicidil trimetilamonio, mientras que la publicación de LIM S-H ET AL: "Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 339, no. 2, 22 de enero de 2004 describe una actividad antimicrobiana del derivado de quitosano contra una variedad de bacterias y hongos. Las publicaciones mencionadas no proporcionan ninguna información acerca de la actividad antiviral del quitosano modificado en general, ni contra el coronavirus en particular.

YOUBIN WU ET AL: "Thermal-sensitive hydrogel as adjuvant-free vaccine delivery system for H5N1 intranasal immunization", BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 33, no. 7, 25 de noviembre de 2011 se refiere al uso de derivados de quitosano como portadores de vacunas contra el virus de la gripe H5N1. Los derivados de quitosano debido a su biocompatibilidad y a la naturaleza mucoadhesiva se utilizan como un hidrogel para depósito de antígenos en el suministro nasal. La obra divulgada no está relacionada con las propiedades antivirales del quitosano. Adicionalmente, esta publicación no menciona los coronavirus o la prevención o tratamiento de dichas enfermedades relacionadas en absoluto.

El objetivo de la invención es proporcionar polímeros de quitosano para uso en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por coronavirus a través de la inhibición de su replicación. La esencia de la invención es el polímero de quitosano de fórmula I, en la que R se selecciona de H o COCH₃ (HTCC) o un polímero de quitosano de fórmula I, en la que R se selecciona de H, COCH₃, o C₁₂H₂₅ (HM-HTCC) para uso en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por coronavirus.

Preferiblemente, los polímeros son para uso en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por alfacoronavirus, y, particular y preferiblemente, en el caso de infecciones provocadas por HCoV-NL63.

Preferiblemente, los polímeros son para uso en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por betacoronavirus, y, particular y preferiblemente, en el caso de infecciones provocadas por MHV de coronavirus de murino.

También preferiblemente los polímeros de acuerdo con la invención son para uso en el tratamiento y prevención de infecciones respiratorias manifestadas por insuficiencia y deterioro de funciones respiratorias en humanos o animales, particular y preferiblemente en el tratamiento y prevención de infecciones de: infecciones del tracto respiratorio superior, infecciones del tracto respiratorio inferior, difteria en niños, infecciones gastrointestinales, infecciones del sistema nervioso, y enfermedad de Kawasaki.

El polímero de quitosano HTCC se obtiene al hacer reaccionar quitosano con cloruro de glicidiltrimetilamonio. HTCC, modificado adicionalmente al sustituir con grupos hidrófobos, particular y preferiblemente cuando los grupos hidrófobos son grupos de n-dodecilo, da HM-HTCC.

Estos polímeros se utilizan preferentemente como solución en forma de un líquido o un aerosol administrado por vía tópica al tracto respiratorio superior (garganta, nariz, árbol respiratorio), por vía oral al sistema gastrointestinal, o por vía intravenosa en el tratamiento y prevención de enfermedades provocadas por coronavirus.

El objeto de la invención también es el polímero de quitosano de la fórmula I, en la que R es H, o COCH₃ (HTCC) y el polímero de quitosano de la fórmula I, en la que R es H, COCH₃ o C₁₂H₂₅ (HM-HTCC) para uso como solución en forma de un líquido o un aerosol administrado al tracto respiratorio.

La invención se ilustra con más detalle mediante los ejemplos de aplicación

Ejemplo 1. Síntesis del derivado de quitosano HTCC

La modificación del polímero se llevó a cabo con base en el método descrito previamente en la literatura (Kaminski K. et al. (2010). J Med Chem 53: 4141-4147). En la reacción de obtención de HTCC mostrada en la Figura 1, 2.5 g de quitosano se dispersó en 100 ml de agua destilada luego se agregó 10 ml de ácido acético al 0.5% y la mezcla se agitó durante 30 min. En la siguiente etapa se vertieron 6.9 ml de cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTMAC).

La reacción se llevó a cabo durante 18 h a 55°C, mientras se mezcló con un agitador magnético. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos para eliminar el quitosano sin modificar suspendido. Luego, el sobrenadante se vertió en el exceso de acetona, y la suspensión resultante se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min.

El sobrenadante se decantó, el precipitado se secó previamente en aire y después se disolvió en agua. La solución resultante se centrifugó de nuevo, y el polímero que se disolvió en el sobrenadante se precipitó utilizando una nueva tanda de acetona. Los ciclos de disolución y precipitación se repitieron dos veces más. El producto de HTCC

obtenido después de la precipitación final se secó en un horno de vacío durante 24 horas. Se obtuvo el polímero con el grado de modificación del 63%, definido como el porcentaje de unidades de glucosa sustituidas con GTMAC.

5 La estructura de quitosano HTCC modificado catiónicamente se confirma por los espectros de FTIR mostrados en la Figura 2, en la que la línea más oscura muestra el espectro de quitosano antes de modificación, y la línea más brillante muestra el espectro de quitosano después de modificación (es decir HTCC).

10 Dentro del espectro FTIR del quitosano modificado se pueden distinguir dos bandas, entre otras, a 1520 cm⁻¹, características de los grupos metilo, presentes en el quitosano modificado, pero no presentes en quitosano sin modificar, y la banda a 1595 cm⁻¹, característica de las aminas primarias, observadas en el espectro de quitosano sin modificar, pero no presente en el espectro del quitosano modificado. En ambos casos, se observa una banda a 1650 cm⁻¹, derivada del C=O en el enlace de amida primaria presente en los grupos amino acetilados.

15 La estructura del quitosano modificado (HTCC) también se confirmó con el uso de espectros de 1H-RMN. Las mediciones de 1H RMN se realizaron en una mezcla de D₂O y CD₃COOD. En el espectro del polímero después de la modificación apareció una banda a 3.2 ppm, característica de los protones de los grupos metilo unidos al nitrógeno de la amina cuaternaria. El espectro de 1H-RMN del quitosano no modificado se muestra en la Figura 3 y aquel de HTCC se muestra en la Figura 4.

20 Ejemplo 2. Síntesis del derivado de quitosano HM-HTCC.

25 Se disolvió HTCC (1 g, 3 mmol de unidades de glucosa) en una mezcla de metanol y solución al 1% de ácido acético (pH = 5.5) en una proporción de 1:1. En 20 ml de metanol se disolvieron 0.3 mmol de N-dodecil aldehído y 1.257 g (20 mmol) de cianoborohidruro de sodio (NaCNBH) y se agregaron a la solución HTCC. La mezcla de reacción se agitó durante 36 h a 20°C hasta que se formó un sol. Después de la finalización de la reacción, el polímero se precipitó utilizando una mezcla 50:50 v/v de metanol y éter de dietilo. El polímero precipitado se lavó con metanol y éter y se secó en vacío. La estructura del producto obtenido (HM-HTCC) se confirmó mediante la medición al medir su espectro 1H RMN.

30 Ejemplo 3. Estudio sobre la citotoxicidad de los polímeros HTCC y HM-HTCC y su actividad anti-alfacoronaviral, sobre el ejemplo del coronavirus NL63 humano.

35 La citotoxicidad de los polímeros HTCC y HM-HTCC se estudió utilizando células LLC-MK2 (ATCC CCL-7; estirpe celular derivada de células epiteliales del riñón de Macaca mulatta) sensibles a infección con los virus HCoV-NL63 y las células A549 (estirpes celulares ATCC CCL-185 derivadas de células de cáncer de pulmón, Homo sapiens) (van der Hoek L. et al. (2004). Nat Med 10: 368-373; Schildgen O. et al. (2006). J Virol Methods 138: 207-210).

40 La citotoxicidad se determinó utilizando dos ensayos. Al principio, se llevó a cabo una prueba colorimétrica sobre, con base en la capacidad de las enzimas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) para reducir el tinte XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) a la sal de formazán coloreada.

45 Debido a que existe una correlación directa entre la viabilidad celular y la cantidad de tinte formado, al medir la absorbancia en la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción para este tinte particular, es posible evaluar el estado de las células. La evaluación de la viabilidad celular también se llevó a cabo utilizando tinte rojo neutro.

50 El rojo neutro (NR) se transporta de forma pasiva en el citoplasma de células vivas y se acumula en los lisosomas. El análisis del número de células viables y su condición se lleva a cabo mediante la evaluación colorimétrica de la muestra, posteriormente a la lisis celular.

55 En el estudio se incubaron células LLC-MK2 o A549 durante 6 días en medio esencial mínimo (MEM) con sales de Hanks y Earle suplementadas con suero bovino al 3%, con concentraciones crecientes de polímero de HTCC o HM-HTCC. Después de este tiempo, la citotoxicidad se evaluó utilizando los dos métodos descritos anteriormente. Adicionalmente, las células se examinaron con un microscopio de contraste de fase para detectar la presencia de una alteración específica a virus en la morfología celular. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de prueba de citotoxicidad y citopaticidad.

Estirpe celular	HTCC CC ₅₀ ^{ab}	HTCC CC ₅₀ ^{ac}	HM-HTCC CC ₅₀ ^{ab}	HM-HTCC CC ₅₀ ^{ac}
LLC-MK2	161.25 µg/ml	191.92 µg/ml	220.09 µg/ml	215.23 µg/ml
A549	143.83 µg/ml	156.46 µg/ml	96.29 µg/ml	96.13 µg/ml

^a CC₅₀ indica la concentración del polímero, que resulta en una disminución de la viabilidad celular en un 50%
^b resultados obtenidos utilizando la prueba de XTT.
^c resultados obtenidos utilizando la prueba de rojo neutro.

Los resultados de la medición llevada a cabo fueron consistentes con las observaciones de cambios morfológicos en las células. En resumen, para ambos polímeros fue similar la concentración CC_{50} (~200 $\mu\text{g/ml}$ para las células LLC-MK2 y 100-150 $\mu\text{g/ml}$ para las células A549).

5 Se evaluó la inhibición de la replicación del coronavirus NL63 humano mediante los polímeros de HTCC y HM-HTCC. El experimento se realizó mediante la infección de células sensibles (LLC-MK2) con virus HCoV-NL63 en presencia de polímeros en concentraciones crecientes. A través del experimento se cultivaron células en medio MEM con sales de Hank y Earle suplementadas con suero bovino al 3%.

10 Después de la infección (dos horas de incubación de la suspensión de virus sobre las células) se sustituyó el medio (MEM con sales de Hank y Earle y suero bovino al 3%) que contenía polímero de HTCC o HM-HTCC a una concentración específica. La evaluación de los cambios morfológicos se llevó a cabo utilizando un microscopio de contraste de fase 6 días después infección. En la presencia de polímero de HTCC (10 $\mu\text{g/ml}$) se observó la inhibición de la replicación viral y no se observó efecto citopático en relación con la replicación del virus. Del mismo modo, en
15 la presencia de polímero de HM-HTCC (50 $\mu\text{g/ml}$) se observó la inhibición de la replicación viral y no se observó efecto citopático (Figura 5).

Por el contrario, el análisis llevado a cabo utilizando quitosano sin modificar no reveló ninguna inhibición de la replicación de HCoV-NL63 por este polímero. Del mismo modo, los derivados catiónicos de otros polímeros (por
20 ejemplo, dextrano o HAP) no mostraron ninguna actividad inhibidora visible, anticoronaviral.

El efecto de los polímeros de HTCC y HM-HTCC sobre la replicación del HCoV-NL63 también se analizó utilizando la RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Para este fin se utilizó el método cuantitativo descrito previamente (Pyrk K.et
25 al. (2006). Antimicrob Agents Chemother 50: 2000-2008). En el estudio se incubaron células LLC-MK2 durante 6 días en medio MEM con sales de Hank y Earle, suplementadas con suero bovino al 3%. Bajo infección, después de 2 horas de incubación de las células con la suspensión de virus, el medio se retiró, las células se lavaron con solución salina regulada con fosfato estéril y se cubrieron con medio fresco (MEM con sales de Hank y Earle, suero bovino al 3%) que contenía polímero de HTCC o HM-HTCC a la concentración específica. Después de incubación, el
30 ARN total se aisló de los sobrenadantes celulares y luego la reacción de transcripción inversa se utilizó como plantilla para la PCR cuantitativa.

El experimento se llevó a cabo para aumentar las concentraciones de los polímeros. Los resultados se muestran en la Figura 6 y 7 y en la Tabla 2. Se observó que los polímeros de HTCC y HM-HTCC provocaron la inhibición de la replicación de HCoV-NL63, mientras que el virus se replicó en la muestra de referencia. El análisis de los datos
35 sobre citotoxicidad (CC_{50}) y actividad antiviral (IC_{50}) permiten la estimación de los índices de selectividad, que también se incluyen en la Tabla 2.

Los gráficos que ilustran la citotoxicidad dependiente de concentración y la inhibición de la replicación del virus mediante el polímero HTCC o mediante el polímero HM-HTCC se muestran en la Figura 6 y Figura 7,
40 respectivamente.

Tabla 2. Inhibición de la replicación viral del virus HCoV-NL63 mediante los polímeros de HTCC y HM-HTCC.

Polímero	IC_{50}	Índice de selectividad SI_{50}
HTCC	$2.75 \pm 1.18 \mu\text{g/ml}$ [13.41 nM]	58.64
HM-HTCC	$68.52 \pm 18.71 \mu\text{g/ml}$ [308.65 nM]	3.21

45 Como es claramente visible, el polímero de HTCC muestra actividad en concentraciones significativamente inferiores, lo que resulta en un mejor índice de selectividad. En el nivel estructural, el HTCC y HM-HTCC son similares, a excepción de los grupos hidrófobos presentes exclusivamente en el polímero de HM-HTCC. Por lo tanto, es posible, que la unión de estos grupos limite la accesibilidad del núcleo de HTCC o altere sus propiedades.

50 Ejemplo 4. Estudio sobre la citotoxicidad de los polímeros de HTCC y HM-HTCC y su actividad anti-alfacoronaviral, en el ejemplo del coronavirus NL63 humano utilizando cultivos epiteliales de la vía respiratoria humana (HAE) completamente diferenciados.

Para determinar si el efecto anti-alfacoronaviral observado es específico a células, se evaluó la actividad inhibidora de los polímeros en un entorno más natural; se utilizaron los cultivos de HAE, que imitan el epitelio de las vías respiratorias conductoras naturales, para este propósito. Los cultivos de HAE se forman por las células epiteliales de las vías respiratorias humanas primarias completamente diferenciadas, de múltiples capas, que crecen en los
55 soportes de plástico revestido con colágeno sobre la interfase aire/líquido. Brevemente, las células epiteliales traqueobronquiales humanas se expandieron sobre el plástico para generar las células de paso 1 y se sembraron a una densidad de 3×10^5 células por pozo en soportes de insertos Transwell permeables (6.5 mm de diámetro). Se generaron cultivos del epitelio de la vía respiratoria humana (HAE) culturas mediante la provisión de una interfaz de
60 aire-líquido durante 6 a 8 semanas para formar cultivos bien diferenciados, polarizados que semejan in vivo el epitelio mucociliar pseudoestratificado.

Los cultivos de HAE se infectaron con HCoV-NL63 mediante inoculación del material infeccioso sobre la superficie apical. Después de 2 h de incubación a 32 °C, el virus no unido se eliminó mediante lavado de 1 × PBS (dos veces, 100 µl cada uno) y los cultivos HAE se mantuvieron a una interfase aire-líquido durante el resto del experimento. Adicionalmente, las superficies apicales de los cultivos HAE infectadas con HCoV NL63 e infectados de forma simulada se enjuagaron cada 24 h con 100 µl de medio que contiene un inhibidor dado.

La citotoxicidad se determinó utilizando una prueba colorimétrica con base en la capacidad de las enzimas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) para reducir el tinte XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) a las sales de formazan coloreadas.

Para analizar la replicación de HCoV-NL63, 72 h después de infección, 100 µl de 1 × PBS se aplicó a la superficie apical de HAE y se recolectó después de 10 min., incubación a 32 °C.

Los gráficos ilustran la inhibición de la replicación del virus por los polímeros de HTCC y HM-HTCC y la citotoxicidad de los polímeros en los cultivos de HAE (según lo determinado por el ensayo de XTT) se muestran en la Figura 8 y 9 respectivamente.

Ejemplo 5. Estudio sobre la citotoxicidad de los polímeros de HTCC y HM-HTCC y su actividad antibetacoronaviral, sobre el ejemplo de virus de la hepatitis de murino (MHV).

La citotoxicidad de los polímeros de HTCC y HM-HTCC se analizó sobre células LR7 susceptibles a infección por el virus MHV (Kuo L. et al. (2000). J Virol 74: 1393-1406; Rossen J.W. et al. (1996). Virology 224: 345-351). La citotoxicidad se determinó utilizando una prueba colorimétrica con base en la capacidad de las enzimas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) para reducir el tinte XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) a las sales de formazan coloreadas.

Puesto que existe una correlación directa entre la viabilidad celular y la cantidad de tinte formado por la medición de la absorbancia en la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción para este tinte particular, es posible evaluar el estado de las células. La evaluación de la viabilidad celular también se llevó a cabo utilizando tinte rojo neutro.

Dentro del estudio, se incubaron células LR7 durante 48 horas en el Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) definido suplementado con suero bovino al 3%, con concentraciones crecientes de polímero de HTCC o HM-HTCC. Después de este tiempo, la citotoxicidad se evaluó de acuerdo con la descripción anterior. Adicionalmente, se inspeccionaron las células para alteraciones morfológicas utilizando un microscopio de contraste de fase.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Citotoxicidad de polímeros de HTCC y HM-HTCC

Estirpe celular	HTCC CC ₅₀ ^{ab}	HM-HTCC CC ₅₀ ^{ac}
LR-7	> 100 µg/ml	> 100 µg/ml
^a CC ₅₀ indica la concentración del polímero, lo que resultó en una disminución de la viabilidad celular en un 50% ^b resultados obtenidos utilizando la prueba de XTT ^c resultados obtenidos utilizando la prueba de rojo neutro		

La inhibición de la replicación del coronavirus MHV se analizó con el uso de polímeros de HTCC y HM-HTCC. El experimento se realizó al infectar células sensibles (LR7) con virus MHV en presencia de los polímeros. Durante toda la duración del ensayo, las células se mantuvieron en el medio DMEM suplementado con suero bovino al 3%. Después de dos horas de incubación de las células con el virus, se retiró el medio, las células se lavaron con solución salina regulada con fosfato estéril y se cubrieron con medio fresco (DMEM con suero bovino al 3%) que contenía el polímero de HTCC o HM-HTCC.

Las células se inspeccionaron visualmente para alteraciones morfológicas utilizando un microscopio de contraste de fase, 48 horas después de infección (Figura 10). El impacto de los polímeros de HTCC y HM-HTCC sobre la replicación del virus MHV también se analizó utilizando el cálculo de número de copia de ARN en el medio a través de análisis de RT-PCR en tiempo real. El método cuantitativo se aplicó con el uso de cebadores 5'MHV_NF TGG CCG AAG AAA TTG CTG CTC TTG, 3' MHV_NR GCC TGA CTT CTT TGG TGG CAC TTT GCT 5'MHV_NF TGG CCG AAG AAA TTG CTG CTC TTG, cebadores 3' MHV_NR GCC TGA CTT CTT TGG TGG CAC TTT GCT y sonda fluorescente FAM/TAMRA MHV_Np TTT GGC TAA GCT CGG TAA AGA TGC CG.

La reacción se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas previamente (Pyrk K. et al. (2006). Antimicrob Agents Chemother 50: 2000-2008).

El experimento se llevó a cabo para aumentar las concentraciones de los polímeros. Los resultados se muestran en la Figura 11 y 12 y en la Tabla 3. Se observó que los polímeros de HTCC y HM-HTCC provocaron la inhibición de la replicación del virus MHV, mientras que el virus se replica en la muestra de referencia.

- 5 Los gráficos que ilustran la citotoxicidad dependiente de concentración y la inhibición de la replicación del virus por el polímero de HTCC o por el polímero de HM-HTCC se muestran en la Figura 11 y Figura 12, respectivamente.

Ejemplo 6. Interacción entre el polímero de HTCC y la proteína de espiga del coronavirus HCoV-NL63 (Se-NL63).

- 10 Para estudiar la interacción entre Se-NL63 y HTCC, el polímero se marcó con fluoresceína de acuerdo con el siguiente procedimiento. 150 mg de HTCC se disolvió en una mezcla de 5.0 ml de agua destilada y 15.0 ml de DMSO. Cinco miligramos de isotiocianato de fluoresceína (FITC) se disolvió en 1 ml de acetona, se agregó la solución a la muestra que contenía HTCC, y se mezcló vigorosamente durante 24 h en la oscuridad. Posteriormente, el polímero marcado (FITC-HTCC) se precipitó con acetona y se aisló mediante centrifugación durante 5 min a 4000 rpm. El precipitado se lavó con acetona, se disolvió en agua, se dializó contra agua durante 2 días y adicionalmente contra mezcla de acetona: agua (1:4 v/v) durante 1 día y se secó por congelamiento. Se encontró que el grado de sustitución de FITC-HTCC, definido como el número de grupos de FITC por un grupo de glucosa de HTCC, fue 1.66% con base en los espectros de UV-VIS.

- 20 Los espectros de fluorescencia de FITC-HTCC (en $C_{FITC-HTCC} = 0.5$ g/ml) en agua se evaluaron en una muestra de control y en muestras que contenían concentraciones crecientes de Se-NL63 o albúmina de suero bovino (BSA). La medición se realizó utilizando $\lambda_{ex} = 494$ nm. Se verificó que la proteína Se-NL63 y otros componentes de la muestra no se absorben a esta longitud de onda de excitación y no interfieren con la intensidad de fluorescencia de FITC-HTCC.

- 25 La intensidad de fluorescencia de FITC-HTCC disminuyó significativamente con la concentración creciente de Se-NL63 (Figura 13 y 14). El apagado fuerte de la fluorescencia FITC-HTCC por Se-NL63 indica una interacción fuerte (formación de complejo o unión) entre Se-NL63 y FITC-HTCC. No se observó disminución en la intensidad de fluorescencia de FITC-HTCC en presencia de albúmina de suero bovino (BSA) lo que indica que la BSA no interactúa con FITC-HTCC y, por consiguiente, que existe una cierta especificidad en la interacción entre Se-NL63 y FITC-HTCC.

- 30 Los gráficos que ilustran los espectros de fluorescencia de FITC-HTCC en presencia de 0, 1.0, 2.0 y 2.5 g/ml de Se-NL63 y la dependencia de la intensidad de fluorescencia relativa (I/I_0) de FITC-HTCC a $\lambda = 513$ nm sobre la concentración de Se-NL63 ($\lambda_{ex} = 494$ nm, $C_{FITC-HTCC} = 0.5$ g/ml) se muestran en la Figura 13 y la Figura 14, respectivamente.

Lista de secuencias

- 40 <110> Jagiellonian University

<120> El uso de polímero de quitosano en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por coronavirus.

- 45 <130> 20130516/UJ/PCT/4

<140> PCT/PL2013/000064

<141> 2013-05-16

- 50 <150> PL P.399246

<151> 2012-05-18

<160> 3

- 55 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

- 60

<220>

<223> Virus de Hepatitis de Ratón (cebador directo de ADN sintético)

<300>

ES 2 655 674 T3

<301> Milewska A, Ciejka J, Kaminski K, Karewicz A, Bielska D, Zeglen S, Karolak W, Nowakowska M, Potempa J, Bosch BJ, Pyrc K, Szczubialka K. <302> Inhibidores poliméricos novedosos de HCoV-NL63. <303> Investigación Antiviral
<304> 97<305> 2<306> 112-121<307> 2012-11-29

5 <400> 1
tggccgaaga aattgctgct ctg 24

<210> 2
10 <211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Virus de Hepatitis de Ratón (cebador inverso de ADN sintético)

<300>
<301> Milewska A, Ciejka J, Kaminski K, Karewicz A, Bielska D, Zeglen S, Karolak W, Nowakowska M, Potempa J, Bosch BJ, Pyrc K, Szczubialka K.<302> Inhibidores poliméricos novedosos de HCoV-NL63. <303> Investigación Antiviral<304> 97<305> 2<306> 112-121<307> 2012-11-29

20 <400> 2
gcctgacttc ttggtggca cttgct 27

25 <210> 3
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Virus de Hepatitis de Ratón (sonda de ADN sintético marcada con tintes FAM y TAMRA)

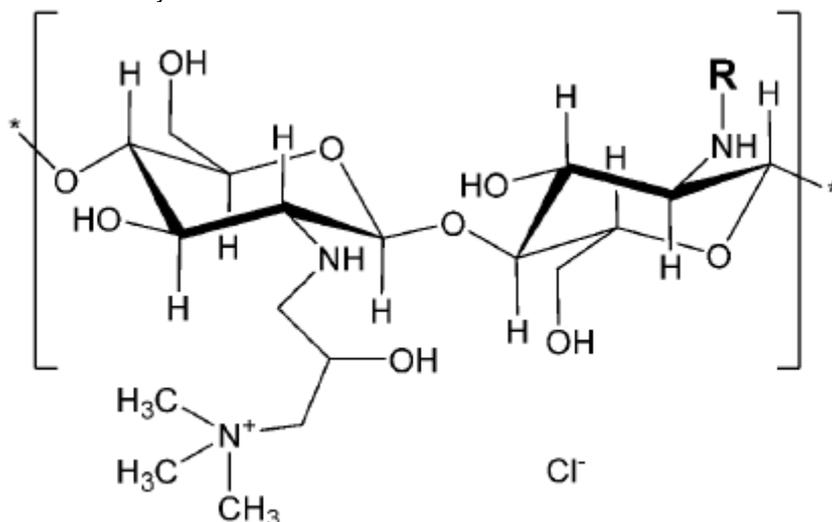
<300>
<301> Milewska A, Ciejka J, Kaminski K, Karewicz A, Bielska D, Zeglen S, Karolak W, Nowakowska M, Potempa EP 2 849 763 B1 8 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 J, Bosch BJ, Pyrc K, Szczubialka K.<302> Inhibidores poliméricos novedosos de HCoV-NL63.<303> Investigación Antiviral<304> 97<305> 2<306> 112-121<307> 2012-11-29

35 <400> 3
tttgctaag ctcgtaaag atgccg 26

40

REIVINDICACIONES

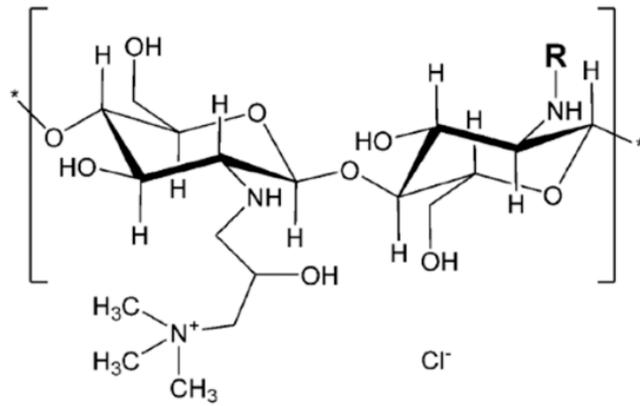
1. Polímeros de quitosano HTCC y HM-TCC de la fórmula I



- 5 en la que R se selecciona de H, COCH₃ (HTCC) o de H, COCH₃, C₁₂H₂₅ (HM-HTCC) para uso en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por coronavirus.
- 10 2. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por alfacoronavirus.
3. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por HCoV-NL63.
- 15 4. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por betacoronavirus.
5. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el tratamiento y prevención de infecciones provocadas por MHV de coronavirus de murino.
- 20 6. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 en el tratamiento y prevención de infecciones respiratorias manifestadas como insuficiencia y deterioro de funciones respiratorias en humanos o animales.
- 25 7. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el tratamiento y prevención de infecciones seleccionadas del grupo:
- infecciones del tracto respiratorio superior;
 - 30 - infecciones del tracto respiratorio inferior;
 - difteria en niños;
 - infecciones del tracto gastrointestinal;
 - 35 - infecciones del sistema nervioso;
 - enfermedad de Kawasaki.
- 40 8. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados porque el polímero de quitosano HTCC se obtiene al hacer reaccionar quitosano con cloruro de glicidiltrimetilamonio.
- 45 9. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados porque el polímero de quitosano HTCC adicionalmente se modifica al sustituir mediante grupos hidrófobos que producen el polímero HM-HTCC.

10. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizados porque los grupos hidrófobos son grupos n-dodecilo.

5 11. Los polímeros de quitosano para uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados porque se utilizan como una solución en la forma de un líquido o un aerosol administrado al tracto respiratorio.



Fórmula I

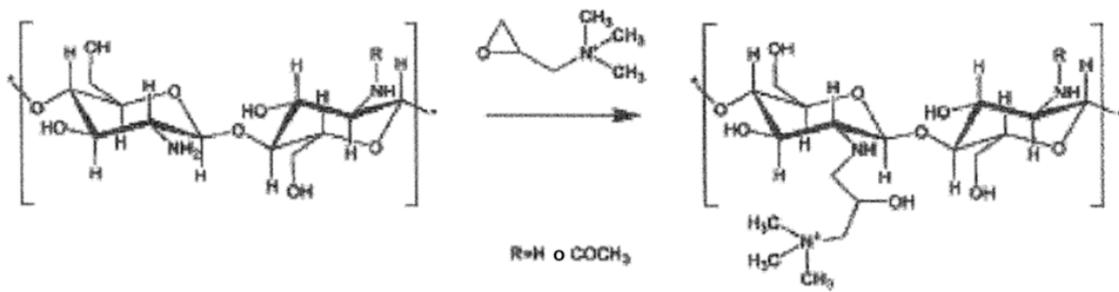


Fig. 1

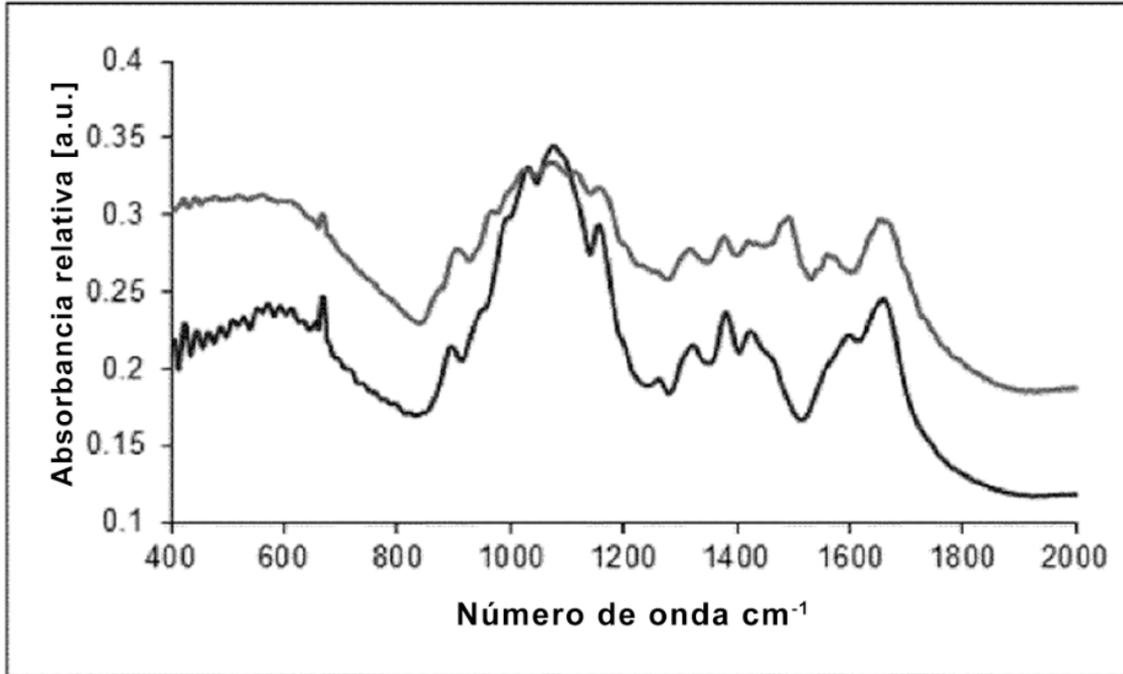


Fig. 2

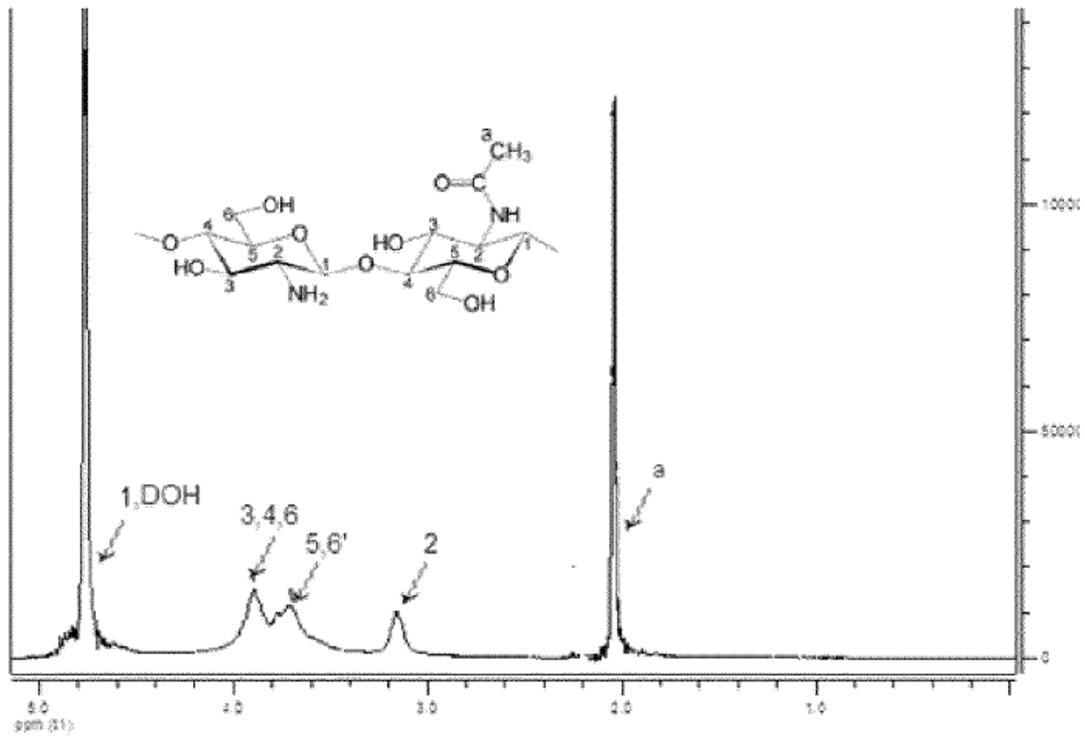


Fig. 3

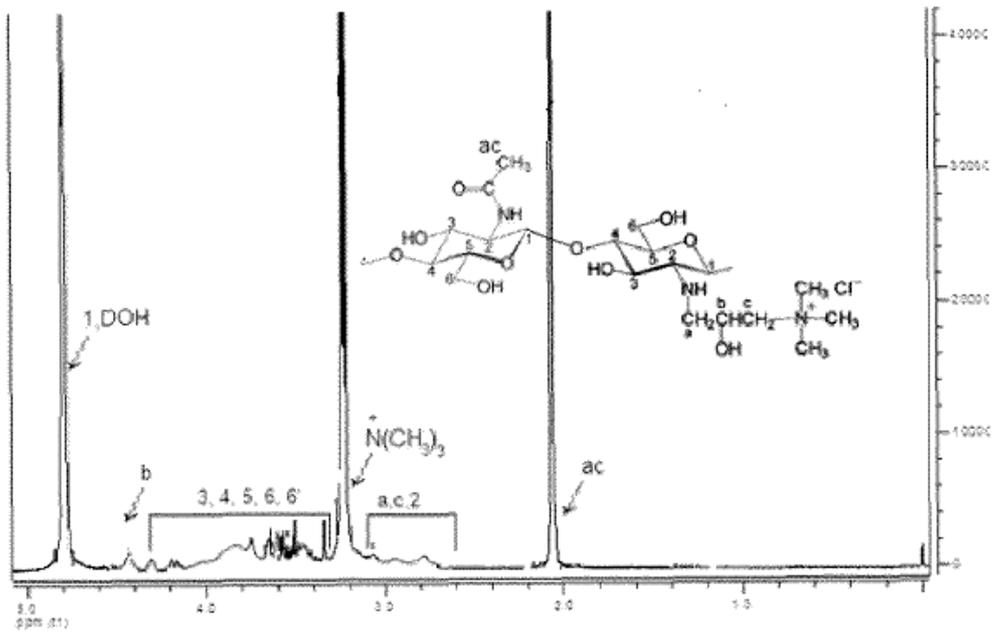


Fig. 4

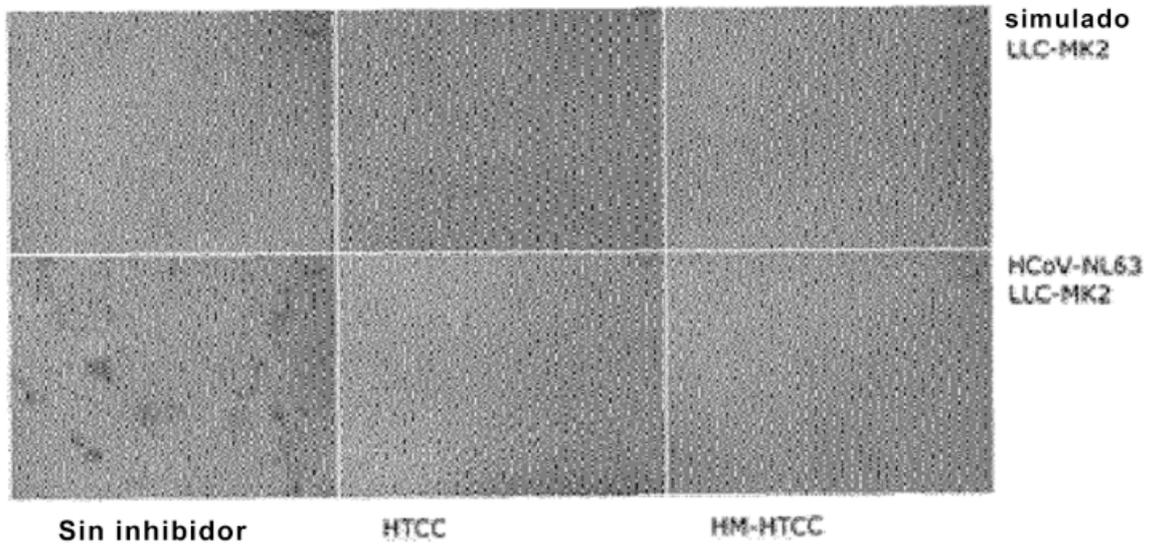


Fig. 5

z

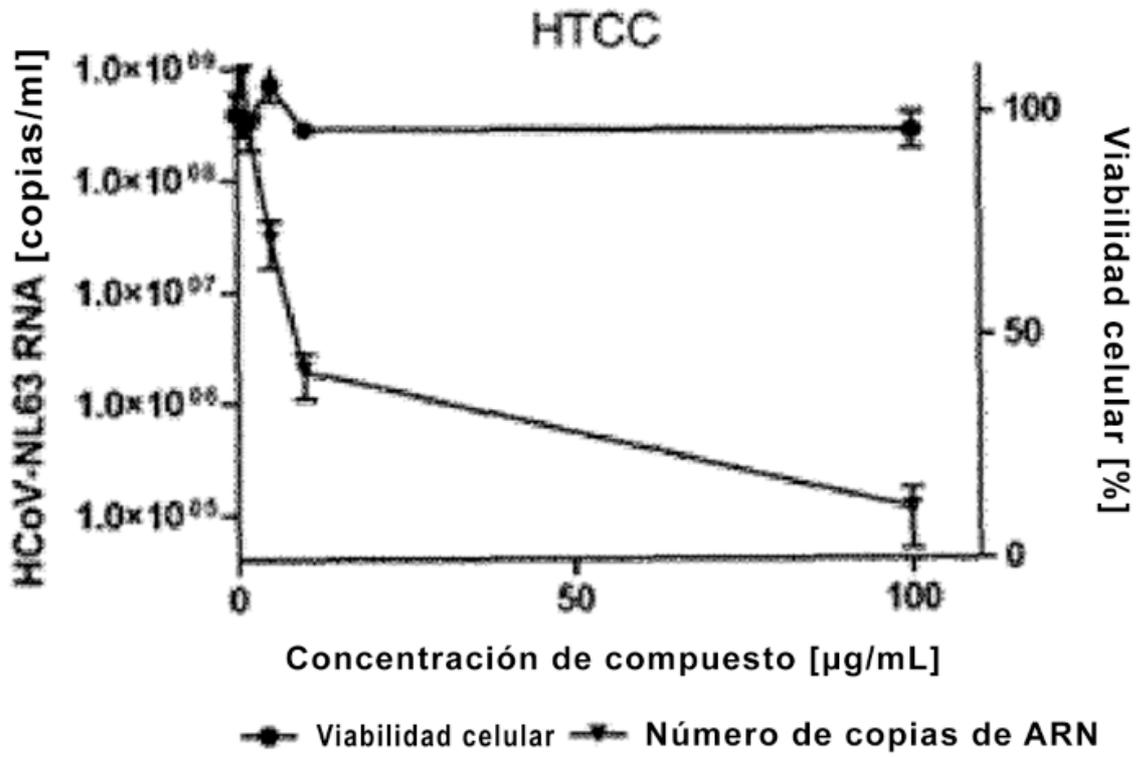


Fig. 6

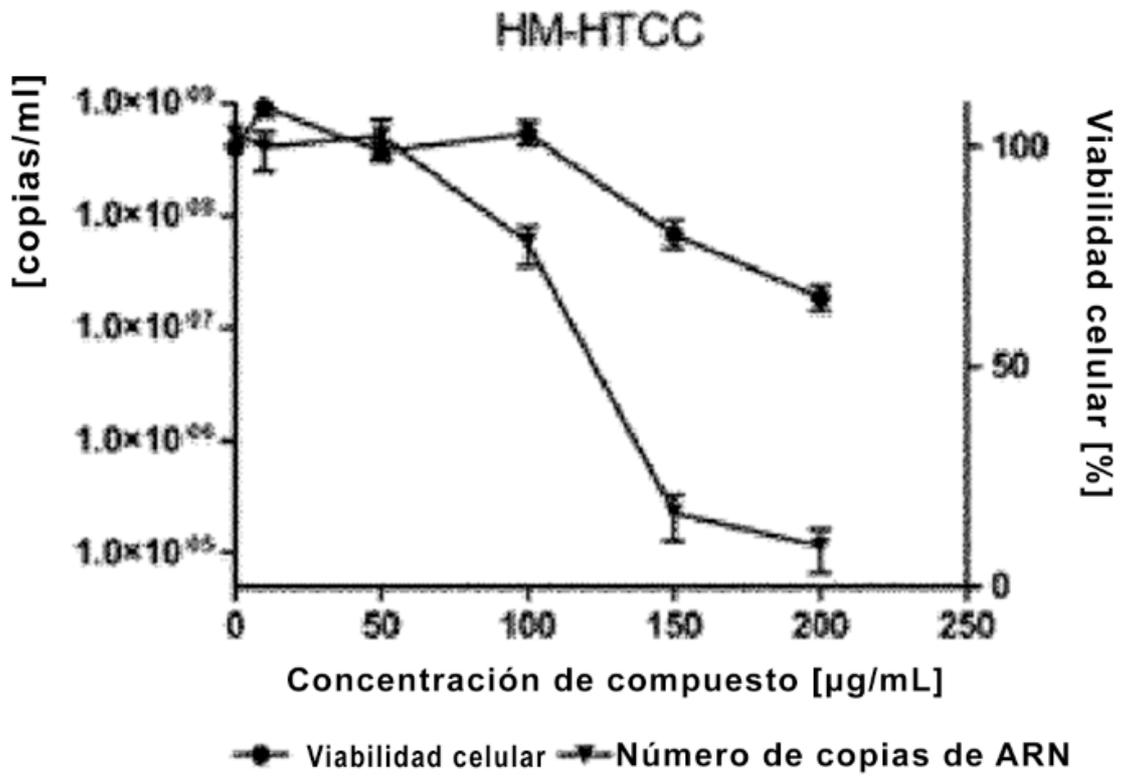


Fig. 7

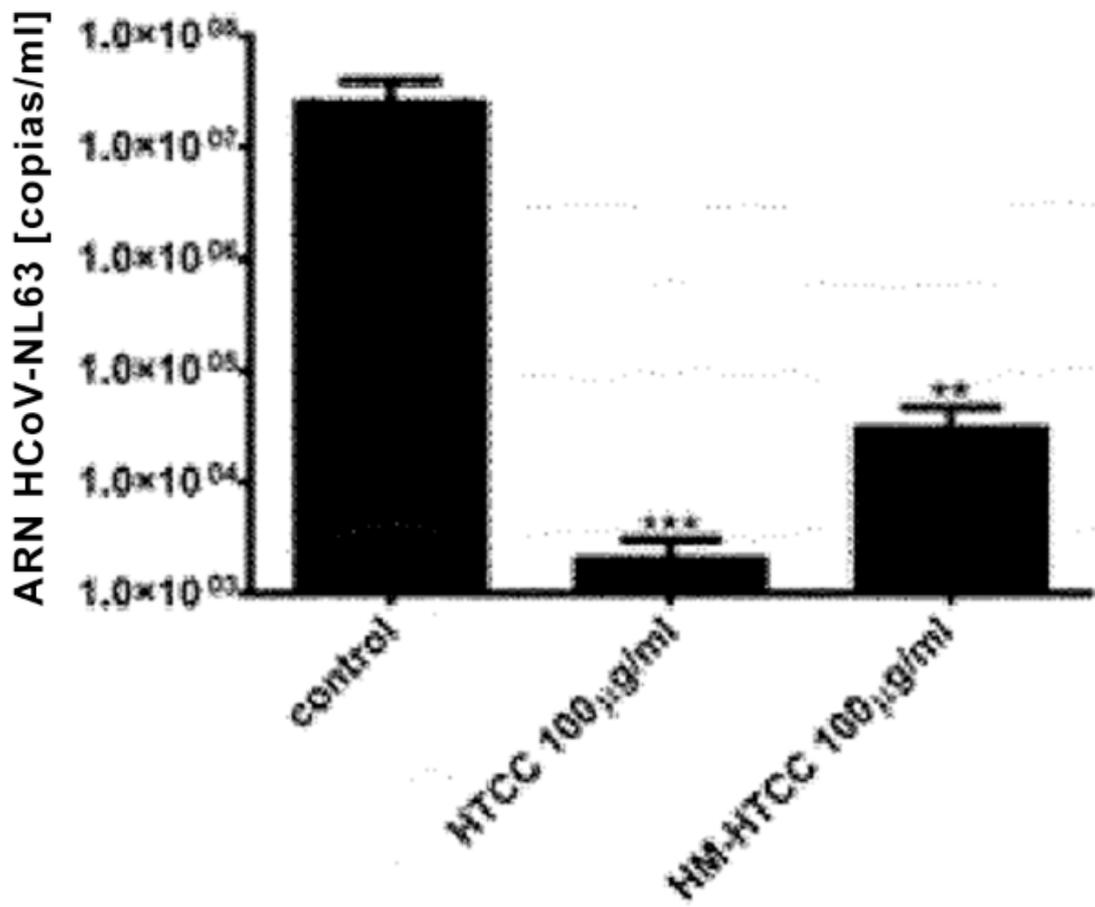


Fig. 8

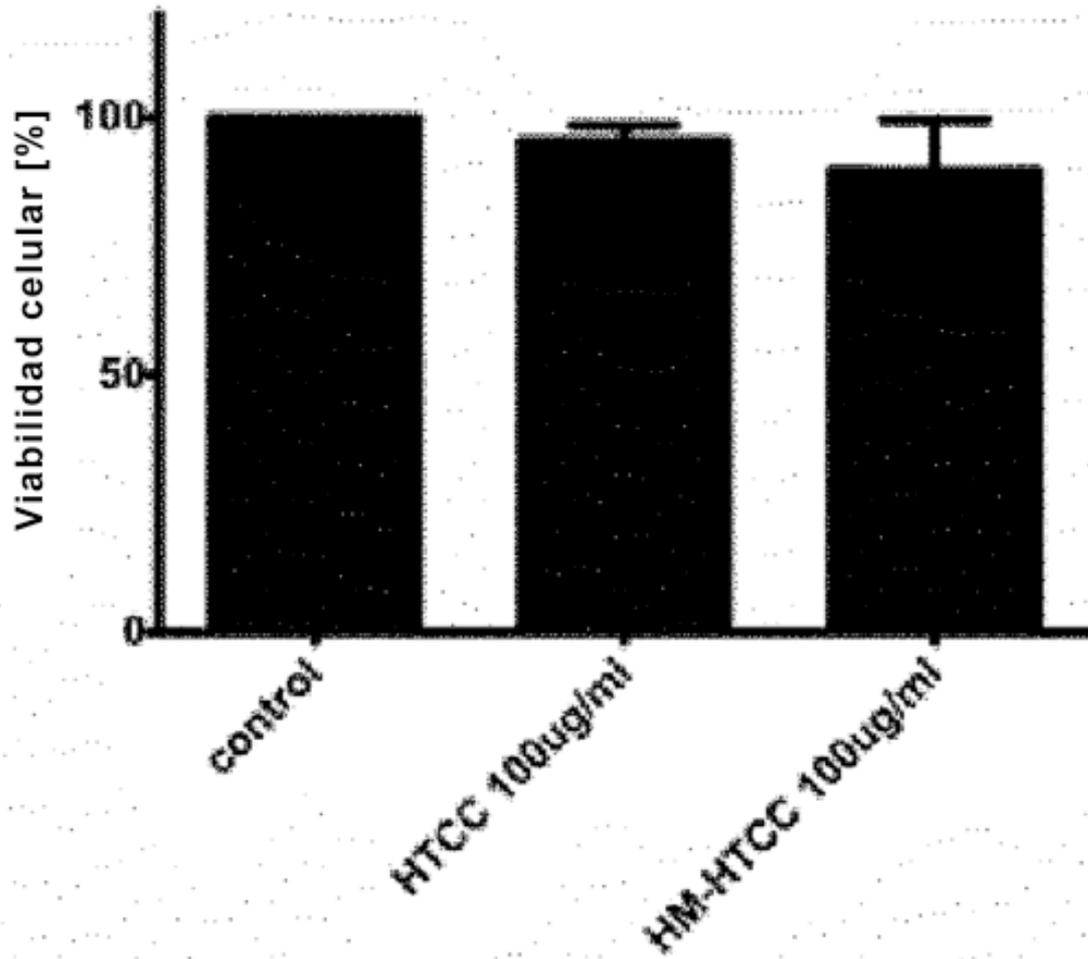


Fig. 9

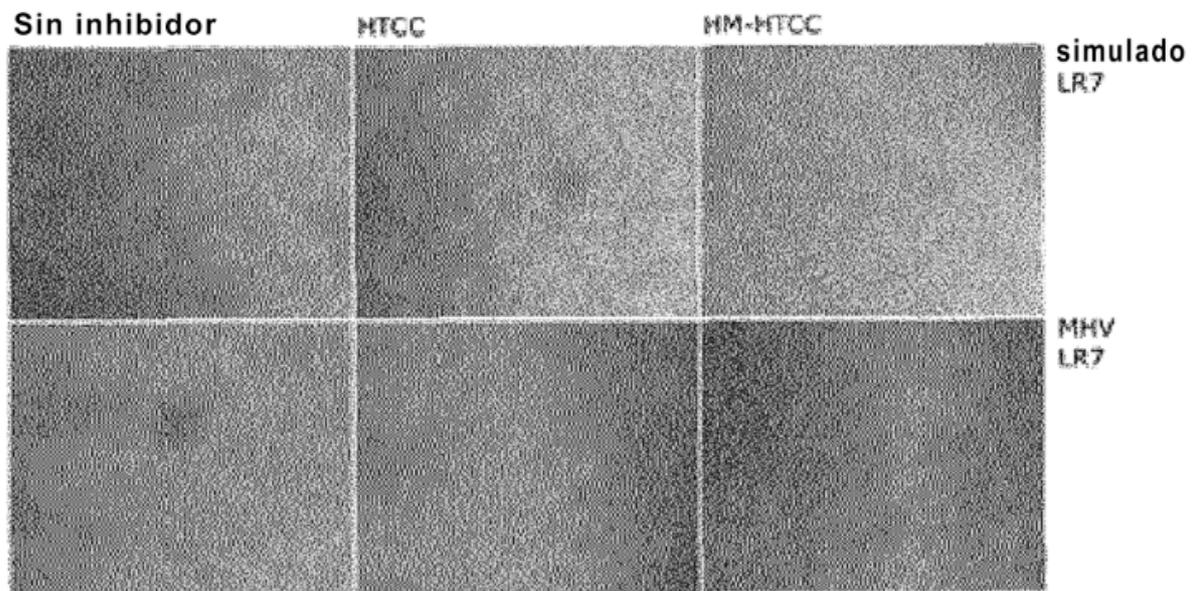


Fig. 10

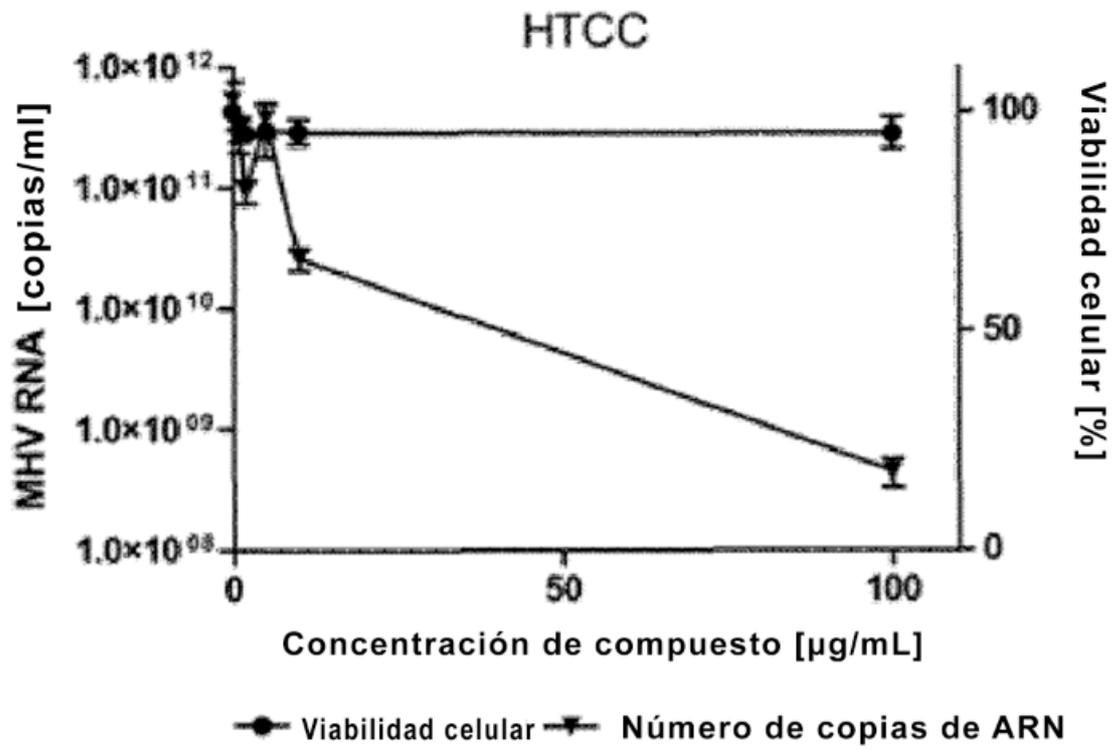


Fig. 11

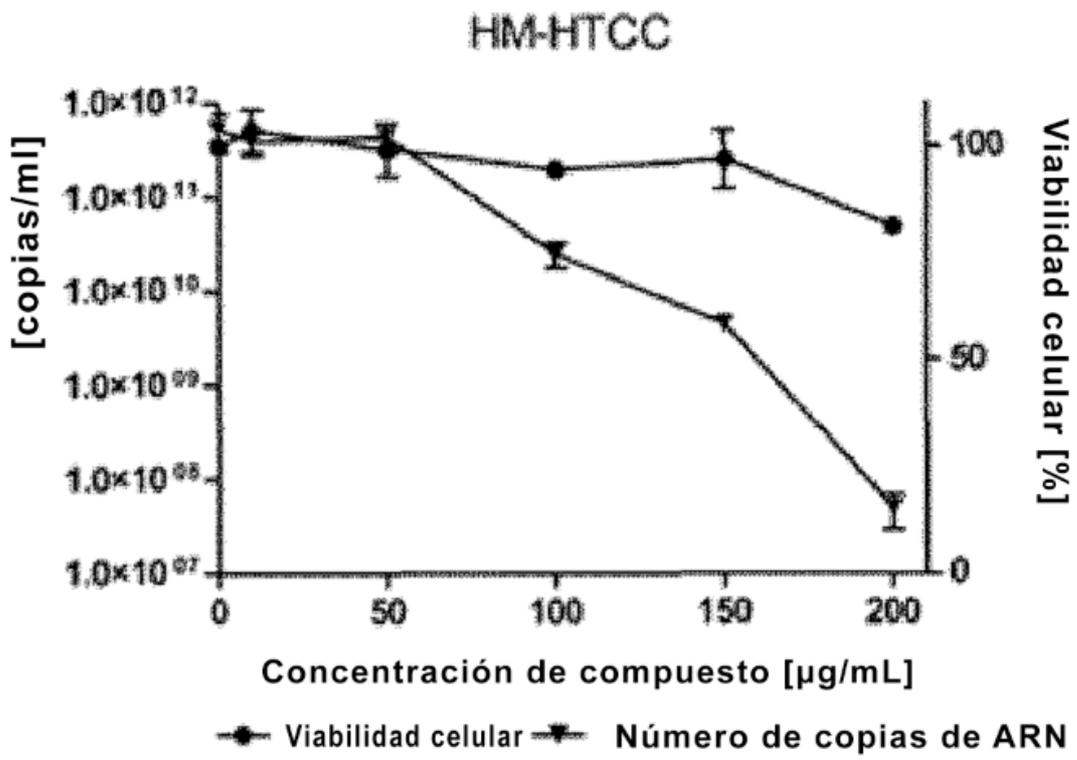


Fig. 12

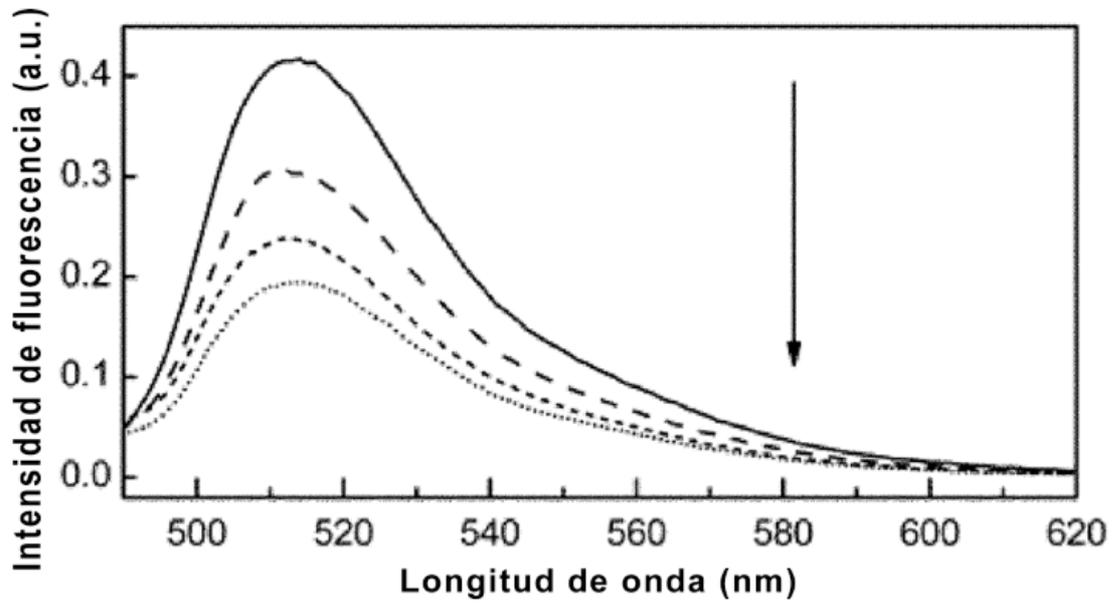


Fig. 13

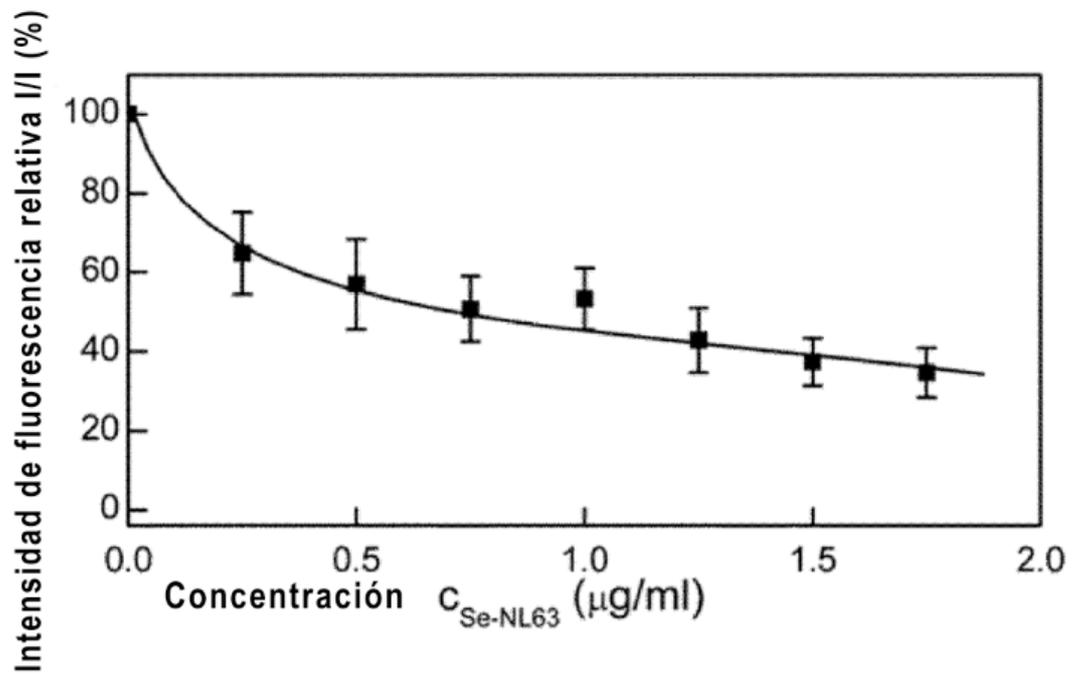


Fig. 14