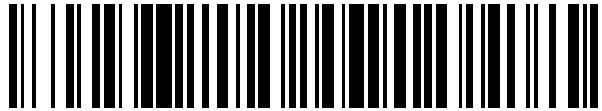


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 191**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61P 31/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2014 PCT/IB2014/061922**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195871**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2014 E 14741948 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 3003333**

54 Título: **Fago T4 para uso en el tratamiento de infección adenovírica causada por HAoV**

30 Prioridad:

03.06.2013 PL 40417613

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

26.02.2018

73 Titular/es:

**WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
(50.0%)**

Ul. Zwirki i Wigury 61

02-091 Warszawa, PL y

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII

DOSWIADCZALNEJ IM LUDWIKA HIRSZFELDA

PAN WE WROCLAWIU (50.0%)

72 Inventor/es:

JAKUBOWSKA-ZAHORSKA, RENATA;

PRZYBYLSKI, MACIEJ;

BORYSOWSKI, JAN;

GÓRSKI, ANDRZEJ y

WEBER-DABROWSKA, BEATA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 656 191 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

Fago T4 para uso en el tratamiento de infección adenovírica causada por HAdV

5 La presente invención se define mediante la reivindicación 1.

El objeto de la presente invención es un uso novedoso de bacteriófagos en medicina. En particular, la presente invención se refiere a un uso novedoso de bacteriófagos en la prevención o tratamiento de infecciones causadas por virus causantes de enfermedades en seres humanos.

10 Hay adenovirus conocidos de la especie C (en particular el tipo 5), que son responsables de infecciones en seres humanos, que están relacionadas en particular con el aparato respiratorio. También hay virus bacterianos conocidos, en particular el fago T4.

15 A pesar del progreso en ciencias biomédicas, hay una constante necesidad para fármacos novedosos capaces de tratar enfermedades causadas por virus, en particular adenovirus. Inesperadamente, tal fin definido se ha conseguido en la presente invención.

20 El objeto de la presente divulgación es el uso de una cepa de bacteriófagos en la fabricación de una preparación para mejorar el estado de salud de pacientes infectados por adenovirus, en donde preferiblemente la preparación fabricada se usa para el tratamiento o prevención de infecciones de adenovirus, en particular las causadas por HAdV, preferiblemente HAdV-5. Preferiblemente, la cepa de bacteriófago usada es el fago T4 o derivados del mismo.

25 Los bacteriófagos usados según la presente invención deben carecer de contaminantes perjudiciales, tal como endotoxinas bacterianas. Las cepas bacterianas apropiadas se pueden obtener, por ejemplo, usando los métodos descritos en las solicitudes polacas de patente por el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental de la Academia Polaca de Ciencias en Breslavia: P.348740 del 18 de julio, 2001, P 354822 del 30 de junio, 2002, P.355355 del 5 de agosto, 2002, o la solicitud internacional PCT/PL02/000053 fechada el 18 de julio, 2002.

30 Inesperadamente, resultó que preparaciones de bacteriófagos, además de propiedades antibacterianas, son no tóxicas para células humanas y muestran actividad contra adenovirus. En particular, disminuyen la actividad infecciosa de adenovirus HAdV contra células humanas y disminuyen el nivel de replicación intracelular de los adenovirus.

35 Inesperadamente, resulta (como se muestra en los resultados posteriormente) que se pueden usar bacteriófagos, particularmente el fago T4 o derivados del mismo, con éxito para el tratamiento o prevención de infecciones adenovíricas, en particular las causadas por HAdV.

40 En particular, se debe entender que los derivados del fago T4 que se pueden usar según la presente divulgación es una cepa de bacteriófagos que posee en una de sus proteínas de superficie, particularmente la proteína p24, el dominio KGD (Lys-Gly-Asp), gracias al cual se puede unir al receptor celular CD51/CD61, lo que significa integrinas de la familia ITGAV ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$). Tales cepas de bacteriófagos se pueden contener usando aislamiento de fuentes naturales, así como métodos de biología molecular comúnmente accesibles.

45 Puesto que los adenovirus humanos (HAdV) se adsorben en la superficie de células a través del receptor CAR, mientras que los receptores responsables para la entrada de virus en las células son las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$, los autores postulan que bloqueando el receptor de superficie para HAdV, los bacteriófagos pueden inhibir la penetración, y por tanto la proliferación de adenovirus en cultivos celulares.

50 Para resumir, la presente invención abre perspectivas novedosas para el uso médico de bacteriófagos, incluyendo en terapia anti-adenovirus.

55 La descripción de la presente invención se ha suplementado con las siguientes figuras:

La figura 1 muestra el efecto inhibitorio de preparaciones que contienen el fago T4 en la adsorción de HAdV-5.

La figura 2 muestra el efecto inhibitorio de una preparación que contiene el fago T4 en la replicación de HAdV-5.

60 Para entender mejor la naturaleza de la presente invención, se ha ilustrado con los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1. El efecto del fago T4 sobre la actividad de HAdV-5 contra células humanas

65 En la primera fase, se evaluó el efecto de preincubar líneas celulares con una suspensión de fago T4 sobre la capacidad de replicación de la especie C (tipo 5), responsable para infecciones del aparato respiratorio (evaluación del efecto de fagos sobre la fase de adsorción de HAdV).

En la siguiente fase, se evaluó el efecto del fago T4 sobre la replicación de HAdV-5 con la inoculación simultánea del cultivo celular con el fago y adenovirus (evaluación del efecto del fago sobre la replicación de HAdV).

5 Para los experimentos se seleccionaron dos tipos de líneas celulares: (i) una línea celular incapaz de producir interferón (A549, línea tumoral continua derivada de un epiteloma de laringe) y (ii) una línea celular capaz de sintetizar interferón (HEK-293, línea embrionaria humana transfectada derivada de epitelio de riñón). Ambas líneas son totalmente susceptibles a infecciones por adenovirus.

10 La evaluación del efecto del fago T4 sobre la actividad infecciosa de adenovirus de especie C en células de la línea inmortalizada A549 y la línea celular HEK-293 humana diploide.

1. Materiales

15 A. Cultivos celulares:

- Línea inmortalizada A₅₄₉ (línea de tumor de laringe humano, ATCC-CCL-185)
- Línea diploide HEK-293 (línea celular embrionaria humana transformada con adenovirus de tipo 5, ATCC-CCRL-1573).

20 B. Virus: Adenovirus humanos (HAdV), especie C, tipo 5, ATCC VR-5 (que causa infecciones del aparato respiratorio superior).

25 C. Bacteriófago T4 (*E. coli*) obtenido en el Instituto de Inmunología y Terapia Experimental de la Academia Polaca de Ciencias en Breslavia. Título del bacteriófago: 2×10^{10} , contenido en lipopolisacárido (LPS) en la preparación de fago: 163,5 UE/ml.

D. Preparación control de LPS que contiene 13,0 UE/ml de lipopolisacárido.

30 2. Metodología

A. Producción celular

- 35 a. Línea inmortalizada A₅₄₉. Las células se pasaron de forma continua en medio de Eagle con suero fetal de ternera al 10% y antibióticos.
- b. Línea diploide HEK-293. Las células se pasaron de forma continua en medio de Dulbecco con suero fetal de ternera al 10% y antibióticos.

40 Después de obtener las poblaciones iniciales, las células se hicieron proliferar en cantidades necesarias para el experimento y se guardaron en medio de Eagle (A₅₄₉) o medio de Dulbecco (HEK-293), con suero fetal de ternera al 10% y dimetilsulfóxido al 10% a una temperatura de -70°C. Los cultivos celulares anteriormente mencionados constituyeron un sustrato para la proliferación y titulación de HAdV-5 VR-5 y evaluación de la actividad antiviral del fago T4.

45 B. La proliferación de HAdV-5 se realizó en ambas de las líneas celulares anteriormente mencionadas. Los cultivos se infectaron con suspensiones de virus que contenían 1 DICT₅₀/célula (dosis infectiva en cultivo de tejidos). Se realizó la recogida del virus después de alcanzar el 100% de citopatía característica de HAdV. Los viriones intracelulares se liberaron usando ciclos de congelación-descongelación, y el sobrenadante tras la centrifugación resultante se hizo alícuotas en ampollas y se almacenó a una temperatura de -70°C. Los conjuntos de virus obtenidos de ambas líneas celulares se ensayaron cada vez para actividad infectiva.

50 C. Evaluación de la actividad infecciosa de HAdV-5. Se evaluó la actividad infecciosa de los adenovirus en cultivos maduros, de 24 horas de células A₅₄₉ y HEK-293. Después de 60 minutos de incubar el virus con las células a una temperatura de 37°C, los cultivos se enjuagaron con una solución de PBS, y las células infectadas se suplementaron con medio de mantenimiento de Eagle o Dulbecco dependiendo de la línea celular, con la adición de suero fetal de ternera al 2% y antibióticos. Se evaluó el título del virus después de 48 horas de incubación a una temperatura de 37°C basado en la evaluación microscópica del efecto citopático (ECP). El título del virus infectivo se calculó usando el método de Reed-Munch y se expresó en términos de logaritmos en base 10 de DICT₅₀. La actividad infectiva de HAdV-5 se evaluó cada vez para cada experimento de preparación de fagos.

60 D. Preparar la preparación de fagos. La preparación de fagos obtenida se diluyó de modo que se obtuvo una preparación que contenía LPS a una concentración igual a la de la preparación de LPS control (13,0 UE/ml). Esta preparación, que contenía el fago T4 a un título de $1,47 \times 10^9$, se usó en experimentos posteriores.

65 E. Determinación de la citotoxicidad de la preparación de fagos y preparación de LPS control. La evaluación de citotoxicidad al microscopio se realizó basado en la morfología celular en términos de efecto citopático después de

una incubación de 48 horas de células A₅₄₉ y HEK-293 a una temperatura de 37°C en presencia de la suspensión de fago T4 a un título de 1,47x10⁹, que contenía 13,0 UE/ml de LPS o la preparación control que contenía 13,0 UE/ml de LPS. Ambas preparaciones se diluyeron diez veces hasta 1x10⁻⁷. Las preparaciones usadas en los experimentos de A549 se diluyeron con medio de Eagle que contenía suero fetal de ternera al 2%, mientras que en los experimentos con HEK-293 se usó medio de Dulbecco que contenía suero de ternera fetal al 2%.

F. La evaluación del efecto de los fagos sobre la fase de adsorción de adenovirus se basó en la introducción del fago T4 a un título de 1,47x10⁹ a 1,47x10³ UFP/ml en cultivos celulares maduros de ambos tipos durante 2 horas de incubación a una temperatura de 37°C. A continuación, después de que se enjuagara el fago, los cultivos se infectaron con una suspensión de HAdV-5 a dosis de 10 y 100 DICT₅₀/ml durante una hora a una temperatura de 37°C. Después de enjuagar de nuevo los cultivos se incubaron durante 48 horas a 37°C, y después los viriones intracelulares se liberaron usando el método de congelación-descongelación en cultivos infectados. Las suspensiones de virus resultantes se titularon usando el método de Reed-Munch y se compararon con el virus control.

G. El efecto del fago sobre la fase de replicación de HAdV-5 intracelular también se evaluó usando en ambos los tipos celulares anteriormente mencionados y se basó en la infección de ambos tipos de cultivos con una suspensión de adenovirus, como se ha mostrado anteriormente, con una incubación de una hora a una temperatura de 37°C. A continuación, después de enjuagar el adenovirus, se suplementaron los cultivos apropiados con títulos de fago T4 análogos a los del punto 5. Los cultivos se incubaron durante 48 horas a una temperatura de 37°C. La determinación del título de los viriones intracelulares y HAdV-5 se realizaron como en el punto F.

H. En la fase final, se determinó la actividad inhibidora del fago T4 a través del método de reducción del título de HAdV-5. Se recogieron todas las muestras, tanto de experimentos que evalúan el efecto del fago sobre la fase de adsorción, como la replicación de adenovirus. Después de liberar los viriones intracelulares, se evaluó la actividad infecciosa del virus en cultivos celulares apropiados, haciendo diluciones en serie (de 1x10⁻¹ a 1x10⁻⁸) de todas las muestras. El título del virus se determinó basado en la aparición del efecto citopático (ECP). La actividad antiviral del fago T4 evaluado se determinó basada en la reducción del título en relación al virus control usado para infectar los cultivos sin una adición del fago T4. Estos valores se expresaron en términos de la DICT₅₀ de HAdV-5 VR5. Los valores obtenidos de tres experimentos consecutivos para cada línea celular se definieron en términos de DI₅₀, una unidad que indica reducción del título de HAdV-5 causada por el fago T4.

3. Resultados

A. Evaluación de la citotoxicidad de la preparación de fago y preparación de LPS control.

Después de una incubación de 48 horas de células A₅₄₉ y HEK-293, en ambas líneas celulares no se observó efecto citotóxico, en todo el intervalo de diluciones de la preparación del fago, ni en la preparación de LPS control.

B. Evaluación de bacteriófagos T4 sobre la fase de adsorción de adenovirus de la especie C (HAdV-5) – Figura 1

B.1. HAdV-5 a un título de 100 DICT₅₀, línea A549, resultados promediados de 12 determinaciones

Título del bacteriófago T4	Título de HDaV-5 control	Título de HDaV-5 en líneas tratadas con el fago T4	Reducción del título de HDaV-5 en relación al control [log ₁₀ del título]
1,47x10 ⁹ UFP/ml	5,62x10 ⁴	3,16x10 ¹	3,26
1,47x10 ⁸ UFP/ml		3,16x10 ¹	3,26
1,47x10 ⁷ UFP/ml		8,6x10 ¹	2,82
1,47x10 ⁶ UFP/ml		5,62x10 ²	2,00
1,47x10 ⁵ UFP/ml		1,78x10 ³	1,50
1,47x10 ⁴ UFP/ml		5,62x10 ³	1,00
1,47x10 ³ UFP/ml		5,62x10 ³	1,00

Título del bacteriófago T4 que inhibe la proliferación de HAdV-5 en el 50% (CI₅₀) = 3,83x10⁵ (DE = 0,456 log₁₀ del título de T4).

B.2. HAdV-5 a un título de 10 DICT₅₀, línea A549, resultados promediados de 12 puntos de datos

Título del bacteriófago T4	Título de HDaV-5 control	Título de HDaV-5 en líneas tratadas con el fago T4	Reducción del título de HDaV-5 en relación al control [log ₁₀ del título]
1,47x10 ⁹ UFP/ml	3,16x10 ³	1,00x10 ¹	2,50
1,47x10 ⁸ UFP/ml		1,00x10 ¹	2,50
1,47x10 ⁷ UFP/ml		1,00x10 ¹	2,50

ES 2 656 191 T3

1,47x10 ⁶ UFP/ml		1,36x10 ¹	2,14
1,47x10 ⁵ UFP/ml		2,30x10 ¹	1,17
1,47x10 ⁴ UFP/ml		2,15x10 ²	0,67
1,47x10 ³ UFP/ml		6,80x10 ²	0,17

Título del bacteriófago T4 que inhibe la proliferación de HAdV-5 en el 50% (CI₅₀) = 1,54x10⁵ (DE = 0,165 log₁₀ del título de T4).

5 B.3. HAdV-5 a un título de 100 DICT₅₀, línea HEK-293, resultados promediados de 12 puntos de datos

Título del bacteriófago T4	Título de HDaV-5 control	Título de HDaV-5 en líneas tratadas con el fago T4	Reducción del título de HDaV-5 en relación al control [log ₁₀ del título]
1,47x10 ⁹ UFP/ml	1,39x10 ⁵	1,39x10 ¹	4,00
1,47x10 ⁸ UFP/ml		3,74x10 ¹	3,57
1,47x10 ⁷ UFP/ml		4,64x10 ²	2,48
1,47x10 ⁶ UFP/ml		3,98x10 ³	1,54
1,47x10 ⁵ UFP/ml		2,19x10 ⁴	0,82
1,47x10 ⁴ UFP/ml		1,00x10 ⁵	0,14
1,47x10 ³ UFP/ml		1,00x10 ⁵	0,14

Título del bacteriófago T4 que inhibe la proliferación de HAdV-5 en el 50% (CI₅₀) = 3,57x10⁶ (DE = 0,31 log₁₀ del título de T4).

10

B.4. HAdV-5 a un título de 10 DICT₅₀, línea HEK-293, resultados promediados de 12 puntos de datos

Título del bacteriófago T4	Título de HDaV-5 control	Título de HDaV-5 en líneas tratadas con el fago T4	Reducción del título de HDaV-5 en relación al control [log ₁₀ del título]
1,47x10 ⁹ UFP/ml	1,30x10 ⁴	7,20x10 ¹	2,26
1,47x10 ⁸ UFP/ml		3,17x10 ²	1,61
1,47x10 ⁷ UFP/ml		1,00x10 ⁴	0,11
1,47x10 ⁶ UFP/ml		1,00x10 ⁴	0,11
1,47x10 ⁵ UFP/ml		1,00x10 ⁴	0,11
1,47x10 ⁴ UFP/ml		1,00x10 ⁴	0,11
1,47x10 ³ UFP/ml		1,00x10 ⁴	0,11

Título del bacteriófago T4 que inhibe la proliferación de HAdV-5 en el 50% (CI₅₀) = 6,82x10⁷ (DE = 0,183 log₁₀ del título de T4).

15

C. Evaluación del efecto del fago sobre la fase de replicación de HAdV-5 intracelular – Figura 2

C.1. HAdV-5 a un título de 100 DICT₅₀, línea A549, resultados promediados de 12 puntos de datos

20

Título del bacteriófago T4	Título de HDaV-5 control	Título de HDaV-5 en líneas tratadas con el fago T4	Reducción del título de HDaV-5 en relación al control [log ₁₀ del título]
1,47x10 ⁹ UFP/ml	9,49x10 ⁴	1,08x10 ²	2,94
1,47x10 ⁸ UFP/ml		3,81x10 ²	2,39
1,47x10 ⁷ UFP/ml		7,06x10 ²	2,13
1,47x10 ⁶ UFP/ml		9,99x10 ³	0,97
1,47x10 ⁵ UFP/ml		3,16x10 ⁴	0,48
1,47x10 ⁴ UFP/ml		9,99x10 ⁴	0,00
1,47x10 ³ UFP/ml		9,99x10 ⁴	0,00

Título del bacteriófago T4 que inhibe la proliferación de HAdV-5 en el 50% (CI₅₀) = 2,15x10⁶ (DE = 0,234 log₁₀ del título de T4).

25 C.2. HAdV-5 a un título de 10 DICT₅₀, línea A549, resultados promediados de 12 puntos de datos

Título del bacteriófago T4	Título de HDaV-5 control	Título de HDaV-5 en líneas tratadas con el fago T4	Reducción del título de HDaV-5 en relación al control [log ₁₀ del título]
1,47x10 ⁹ UFP/ml	1,00x10 ⁴	1,01x10 ²	1,99

ES 2 656 191 T3

1,47x10 ⁸ UFP/ml		7,06x10 ⁻²	1,15
1,47x10 ⁷ UFP/ml		1,00x10 ⁻³	1,00
1,47x10 ⁶ UFP/ml		3,16x10 ⁻³	0,50
1,47x10 ⁵ UFP/ml		3,16x10 ⁻³	0,50
1,47x10 ⁴ UFP/ml		3,16x10 ⁻³	0,50
1,47x10 ³ UFP/ml		6,80x10 ⁻²	0,00

Título del bacteriófago T4 que inhibe la proliferación de HAdV-5 en el 50% (CI₅₀) = 8,77x10⁷ (DE = 0,552 log₁₀ del título de T4).

5 C.3. HAdV-5 a un título de 100 DICT₅₀, línea HEK-293, resultados promediados de 12 puntos de datos

Título del bacteriófago T4	Título de HAdV-5 control	Título de HAdV-5 en líneas tratadas con el fago T4	Reducción del título de HAdV-5 en relación al control [log ₁₀ del título]
1,47x10 ⁹ UFP/ml	3,16x10 ⁴	3,50x10 ¹	2,96
1,47x10 ⁸ UFP/ml		4,60x10 ¹	2,84
1,47x10 ⁷ UFP/ml		2,85x10 ²	2,04
1,47x10 ⁶ UFP/ml		3,16x10 ²	2,00
1,47x10 ⁵ UFP/ml		1,46x10 ²	2,34
1,47x10 ⁴ UFP/ml		3,16x10 ³	1,00
1,47x10 ³ UFP/ml		5,62x10 ⁴	0,00

Título del bacteriófago T4 que inhibe la proliferación de HAdV-5 en el 50% (CI₅₀) = 1,18x10⁴ (DE = 0,468 log₁₀ del título de T4).

- 10
4. Conclusiones
1. No advertimos efectos citotóxicos de la preparación del bacteriófago T4 en ninguna de las dos líneas celulares usadas: ni en la línea inmortalizada A₅₄₉ ni en la línea diploide HEK-293.
- 15
2. Se determinó el efecto inequívoco de los bacteriófagos T4 sobre el nivel de proliferación de HAdV-5 en ambas líneas celulares ensayadas, en experimentos para determinar el efecto de los bacteriófagos tanto sobre la adsorción, así como sobre la replicación de HAdV. La reducción en el título infectivo observada en cantidades correspondientes a CI₅₀ era desde 1,10 a 2,34 log₁₀ del título de HAdV-5.
- 20
3. El efecto inhibitor más pronunciado sobre la adsorción de adenovirus de tipo 5 se observó en la línea A₅₄₉ para ambos títulos de virus estudiados (100 y 10 DICT₅₀). Los valores de CI₅₀ para los bacteriófagos fueron 3,83x10⁵ y 1,54x10⁵ UFP/ml, respectivamente.
- 25
4. En la variante experimental que se refiere a la evaluación del efecto de bacteriófagos T4 sobre la replicación de HAdV-5, el efecto más significativo se observó en la línea celular HEK-293 infectada con HAdV-5 a un título de 100 DICT₅₀. El valor de CI₅₀ del bacteriófago fue 1,18x10⁴ UFP/ml.

REIVINDICACIONES

1. Fago T4 para uso en el tratamiento o prevención de infecciones adenovíricas causadas por HAdV, preferiblemente HAdV-5.

5

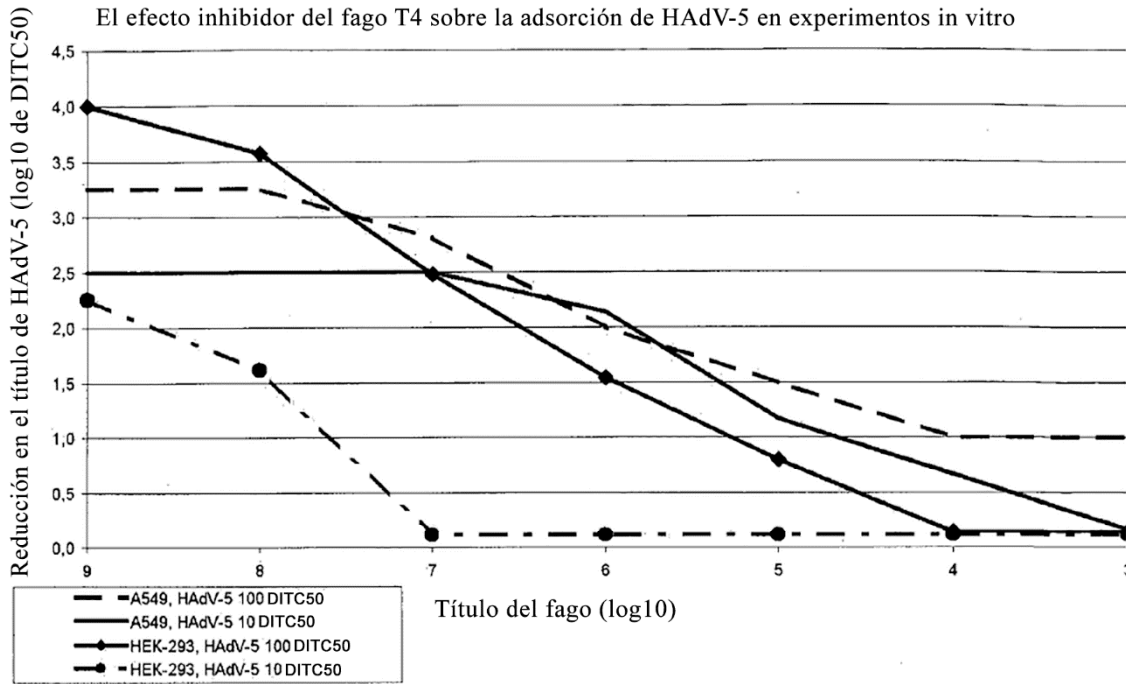


Fig. 1

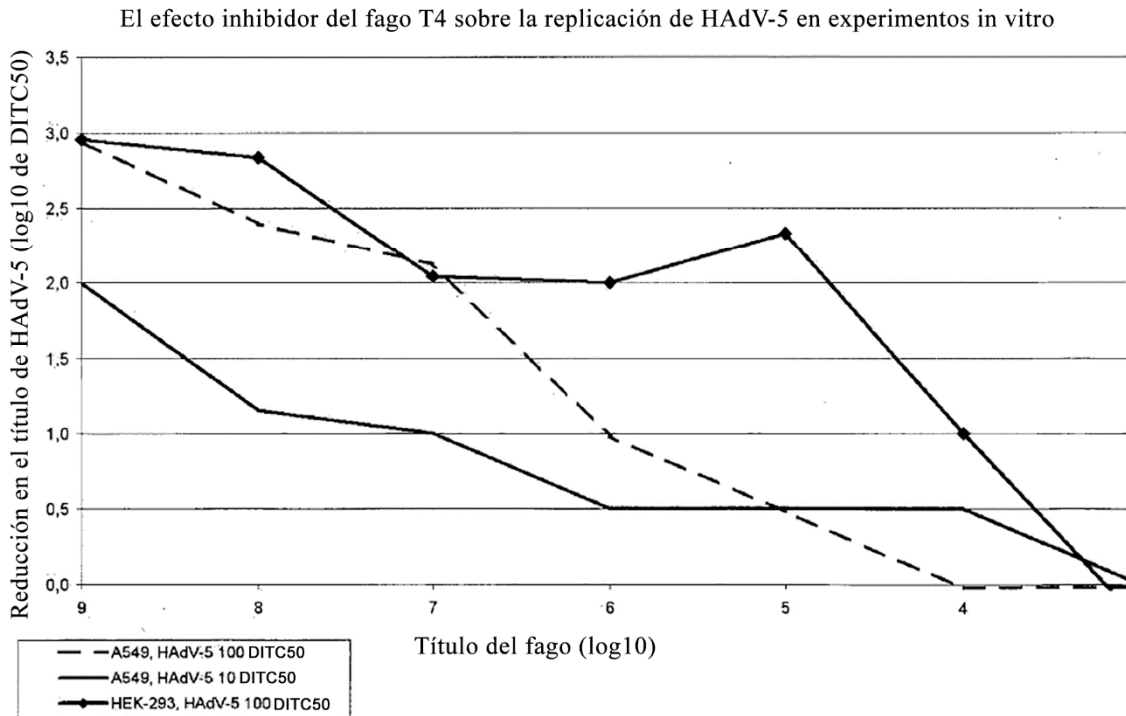


Fig. 2