

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 970 401**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
A61P 11/12 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2013 PCT/US2013/026754**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123521**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2013 E 13749329 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2023 EP 2841092**

(54) Título: **Compuestos y composiciones para uso en un método de tratamiento del virus de parainfluenza**

(30) Prioridad:

17.02.2012 US 201261600545 P
16.11.2012 US 201261727627 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2024

(73) Titular/es:

ANSUN BIOPHARMA, INC. (100.0%)
10045 Mesa Rim Road
San Diego, CA 92121, US

(72) Inventor/es:

MOSS, RON y
LI, TIEJUN

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 970 401 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

Compuestos y composiciones para uso en un método de tratamiento del virus de parainfluenza

ANTECEDENTES

Los virus de la parainfluenza humana (PIV) son causas comunes de enfermedades del aparato respiratorio. Las características clínicas y epidemiológicas de los cuatro PIV humanos difieren. La infección por PIV-1 y PIV-2 se asocia con laringotraqueobronquitis o hinchazón alrededor de las cuerdas vocales y otras partes de las vías respiratorias superiores y medias. PIV-3 a menudo se asocia con bronquiolitis y neumonía. PIV-4 generalmente causa síntomas más leves que los otros tipos de PIV humano.

Los virus de la influenza (IFV) pueden causar infecciones que afectan principalmente a la nariz, la garganta, los bronquios y los pulmones. La infección se caracteriza por la aparición repentina de fiebre alta, dolor muscular, dolor de cabeza y malestar intenso, tos no productiva, dolor de garganta y rinitis. Algunos virus de la influenza se transmiten fácilmente de persona a persona a través de gotitas y pequeñas partículas que se producen cuando las personas infectadas tosen o estornudan. La mayoría de las personas infectadas se recuperan en una o dos semanas sin necesidad de tratamiento médico. Sin embargo, en los muy jóvenes, los ancianos, y aquellos con otras afecciones médicas graves, la infección puede provocar complicaciones graves de la afección subyacente, neumonía y muerte. Además, ciertas cepas y tipos de virus de la influenza pueden causar enfermedades graves incluso en adultos sanos.

Los inhaladores de polvo seco se usan comúnmente para administrar fármacos a las vías respiratorias, por ejemplo los pulmones. Sin embargo, para algunos pacientes, por ejemplo niños, particularmente los menores de 5 años, los ancianos, los pacientes inmunodeprimidos y los enfermos graves, los inhaladores de polvo seco pueden resultar difíciles de usar con eficacia.

Moscona *et al.*, 2010 describen una proteína de fusión de sialidasa recombinante que inhibe la infección por el virus de la parainfluenza humana *in vitro* e *in vivo*. Triana-Baltzer *et al.* describen una revisión de DAS181, una proteína de fusión de sialidasa que protege el epitelio de las vías respiratorias humanas contra la infección por gripe. El documento US 2007/190163 describe tecnología para la preparación de microesferas macromoleculares. El documento US 2011/171132 describe métodos, compuestos y composiciones para el tratamiento y profilaxis en el aparato respiratorio.

FIGURAS

La Figura 1 es un conjunto de fotografías que representan el crecimiento y cultivo viral. Células LLCMK-2 se sembraron 24 horas antes de la infección, y después se inocularon con 0,02 o 0,2 ml de muestra positiva de cultivo viral. Las células eran simplemente subconfluentes antes de la infección. El progreso de la infección se registró 3 y 5 días después de la inoculación. La muerte celular y el CPE son detectables 3 días después de la inoculación, y han progresado significativamente a los 5 días después de la inoculación. Tanto 0,02 como 0,2 ml de inóculo inicial son suficientes para iniciar la infección. NV=No viral. PI=Post-infección.

La Figura 2 es un conjunto de fotografías que representan los resultados del análisis DFA. Las células se cultivaron en cubreobjetos, se infectaron a la TFID50, y después se fijaron 72 horas después de la infección. Después de la fijación, las células se tiñeron usando el ensayo Light Diagnostics PIV3 DFA. La fluorescencia se visualizó bajo el microscopio usando canales específicos para la tinción, y se hicieron fotografías usando el software ProgRes CapturePro (Jenoptik).

La Figura 3 es un conjunto de fotografías que representan placas representativas usando reactivo de DFA.

El ensayo de placas se realizó en una placa de 24 pocillos, y después se tiñó con el reactivo de DFA como se describe en Materiales y métodos. Se muestran placas representativas de cada dilución, y el título final obtenido al contar todas las placas en los pocillos se muestra en el lado derecho de las imágenes. Para obtener el título, los pocillos contables se promediaron y multiplicaron por la dilución. Las placas se representan en verde, mientras que los núcleos se representan en azul. TNTC=Demasiado numerosos para contarlos. PI=Post-infección.

La Figura 4 es un conjunto de fotografías que representan placas representativas usando reactivo de DFA.

El ensayo en placas se realizó en una placa de 24 pocillos, y después se tiñó con el reactivo de DFA como se describe en Materiales y métodos. Se muestran placas representativas de cada dilución, y el título final obtenido al contar todas las placas en los pocillos se muestra en el lado derecho de las imágenes. Para obtener el título, los pocillos contables se promediaron y multiplicaron por la dilución. Las placas se representan en verde, mientras que los núcleos se representan en azul. TNTC=Demasiado numerosos para contarlos. PI=Post-infección.

La Figura 5 es un par de gráficos que representan el ensayo estándar de reducción de placas en los días 6 y 7. Los ensayos de reducción de placas se realizaron en placas de 6 pocillos con concentraciones crecientes de DAS181, y se fijaron 6 o 7 días después de la infección cuando se pudieron visualizar las placas. DAS181 permaneció en la superposición durante todo el ensayo. Las placas se contaron y se representaron gráficamente para determinar los valores de EC50.

La Figura 6 es un conjunto de fotografías que representan la formación de placas representativas mediante análisis de fluorescencia. Cuarenta y ocho horas después de la infección, las células se fijaron, y la formación de placas se visualizó usando el reactivo de PIV3 DFA. Las placas se representan en verde, mientras que los núcleos se representan en azul.

5 La Figura 7 es un gráfico que representa ensayos de reducción de placas realizados por triplicado, y se determinaron valores de EC50 para cada ensayo. Se estableció un valor de EC50 promedio de alrededor de 4 nM usando estos valores.

10 La Figura 8 es un conjunto de fotografías que representan la inhibición de TCID50. Células LLCMK-2 se sembraron 24 horas antes de la infección, y después se infectaron con la TCID50 conocida. Dos horas después de la infección, las placas se fijaron con glutaldehído al 0,05%, y después se tiñeron con un anticuerpo alfaPIV. La mancha oscura representa la propagación del virus.

15 La Figura 9 es un conjunto de fotografías que representan el análisis de la propagación viral. Las células se infectaron a una MOI de 0,1, y entonces se analizó la propagación viral 24, 48 y 72 horas después de la infección, con o sin tratamiento con DAS 181 (10 nM). Las células se fijaron, y entonces se tiñeron con reactivo de DFA específico de PIV3, y se visualizaron bajo el microscopio. La presencia de infección por PIV3 está representada en verde, mientras que los núcleos están representados en azul.

20 La Figura 10 es un gráfico que representa la liberación viral con tratamiento con DAS 181 10 nM. Después de la infección (MOI = 0,1), las células se trataron (o se trataron de forma simulada) con DAS181 10 nM, y entonces el virus infeccioso liberado de las células se midió mediante ensayo de placas. Los sobrenadantes de cultivos tisular (con y sin DAS 181) se analizaron el día 1, 2 y 3, y el título se representó gráficamente a lo largo del tiempo.

La Figura 11 es un gráfico que representa un estudio de liberación viral de PIV3 de 6 días. Las células se infectaron a una MOI baja (0,01), y entonces se trataron, o se trataron de forma simulada, con DAS181 10 nM. La liberación viral se midió mediante la recolección de sobrenadante de cultivo tisular, y el virus infeccioso se analizó mediante un ensayo de placas.

25 La Figura 12 es un conjunto de fotografías que representan la inoculación inicial de una muestra de paciente. Muestras sospechosas de contener PIV3 recolectadas de un paciente de EIND se usaron para inocular células LLCMK2. Los cultivos se monitorizaron para detectar CPE y signos de infección viral. Hacia el día 5 después de la infección, los pocillos inoculados con 0,2 ml de la muestra del paciente exhibieron CPE sustancial y muerte celular, indicativos de una infección viral. De estos pocillos se recogieron virus para su posterior amplificación. La presencia de PIV3 se confirmó mediante ensayo de DFA (Figura 13). El control NV no muestra tinción positiva para el antígeno PIV3, mientras que la muestra de PIV3 infectada muestra que todas las células en el campo son positivas para PIV3 (representadas en verde). Los núcleos están representados en azul.

30 La Figura 13 es un conjunto de fotografías que representan la identificación del tipo viral. Los cultivos virales inoculados se analizaron para detectar la presencia de un virus respiratorio, así como para detectar la presencia de PIV3 específicamente mediante análisis DFA. Las células infectadas se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se tiñeron con los anticuerpos apropiados (ya sea que reconocen un panel de virus respiratorios o específicos para PIV3). La fluorescencia se visualizó bajo el microscopio usando canales específicos para la tinción, y se hicieron fotografías usando el software ProgRes CapturePro (Jenoptik).

La Figura 14 es un conjunto de fotografías que representan placa representativa usando reactivo de DFA.

40 El ensayo de placas se realizó en una placa de 24 pocillos, y luego se tiñó con el reactivo de DFA como se describe en los Materiales y métodos. Se muestra una placa representativa de una dilución, que demuestra la rápida propagación de la placa viral en 48 horas. Para obtener el título, los pocillos contables se promediaron y multiplicaron por la dilución. La placa está representada en verde, mientras que todas las células del campo están representadas en azul.

45 La Figura 15 es un gráfico que representa el ensayo de reducción de placas (PRA). Los ensayos de reducción de placas se realizaron por triplicado, y se determinaron los valores de EC50 para cada ensayo. Se estableció un valor de EC50 promedio de ~28 nM usando estos valores.

50 La Figura 16 es un conjunto de fotografías que representan la inhibición de TCID50. Células LLCMK-2 se sembraron 24 horas antes de la infección, y después se infectaron con la TCID50 conocida. 2 horas después de la infección, las placas se lavaron para eliminar el virus residual, y entonces se cubrieron con agarosa/medio que contenía DAS 181 diluido en serie. 3 días después de la infección, las placas se fijaron con glutaldehído al 0,05%, y después se tiñeron con un anticuerpo aPIV3. La fluorescencia verde indica la propagación del virus a lo largo de la monocapa, mientras que todas las células están indicadas por la tinción azul.

55 La Figura 17 es un gráfico que representa los resultados de un estudio de liberación viral de PIV3 de 3 días. Las células se infectaron a una MOI baja (0,01), y después se trataron o se trataron simuladamente con DAS 181 100 nM.

La liberación viral se midió mediante la recolección de sobrenadante de cultivo tisular, y el virus infeccioso se analizó mediante un ensayo de placas.

La Figura 18 es un gráfico que representa la reducción de la carga viral (los días de dosificación se indican en rojo).

La Figura 19 es un gráfico que representa los cambios en la carga viral.

5 La Figura 20 es un gráfico que representa los cambios en la carga viral en función del día de tratamiento.

La Figura 21 es un conjunto de gráficos que representan el tratamiento con prednisona y tacrolimus, la administración de oxígeno, y la carga de PIV3.

SUMARIO

Los aspectos de la invención para los que se busca protección se definen en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

10 La descripción puede contener información técnica adicional, que aunque no forma parte de la invención reivindicada, se proporciona para ubicar la invención en un contexto técnico más amplio e ilustrar posibles desarrollos técnicos relacionados. Las referencias aquí a métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal deben entenderse como referencias a medicamentos para uso en un método de tratamiento.

15 En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para uso en un método para tratar la infección por el virus de la parainfluenza o de la gripe, comprendiendo el método administrar dicha composición al aparato respiratorio de un paciente, en el que la composición está en forma líquida y la administración es mediante nebulizador, en el que se administra al paciente 0,1 - 10 mg de la proteína por día.

20 Se describen aquí métodos y formulaciones para tratar pacientes usando formulaciones líquidas (por ejemplo, nebulizadas) de proteínas, por ejemplo proteínas de fusión, que tienen actividad de sialidasa (por ejemplo, DAS 181). Los métodos y formulaciones se pueden usar para tratar pacientes infectados con PIV o virus de la gripe (IFV). También se describen aquí métodos para tratar la infección por PIV en pacientes inmunodeprimidos usando proteínas, por ejemplo proteínas de fusión, que tienen actividad de sialidasa (por ejemplo, DAS181). Estos inmunodeprimidos pueden tratarse con formulaciones secas o formulaciones líquidas (por ejemplo, nebulizadas).

25 Las proteínas útiles que tienen actividad sialidasa incluyen DAS181, una proteína de fusión recombinante de 46 kDa que consiste en un dominio funcional de sialidasa fusionado con una secuencia de unión a anfíregulina glicosaminoglicano que ancla la sialidasa al epitelio respiratorio. Al escindir los ácidos siálicos (SA) de la superficie de la célula hospedante, DAS 181 inactiva los receptores de la célula hospedante reconocidos tanto por PIV como por IFV, y por lo tanto potencialmente hace que las células hospedantes sean resistentes a la infección por PIV e IFV.

30 Se describe aquí un método para tratar la infección por PIV o IFV en un paciente, comprendiendo el método: administrar al aparato respiratorio del paciente una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición líquida (por ejemplo, una composición nebulizada) que comprende una proteína que tiene actividad de sialidasa. También se describe aquí un método para tratar a un sujeto en riesgo de infección por PIV o IFV, comprendiendo el método: administrar al aparato respiratorio del sujeto una composición (por ejemplo, una

35 cantidad terapéuticamente eficaz de una composición) que comprende una composición líquida (por ejemplo, una composición nebulizada) o una formulación en polvo seco que comprende una proteína que tiene actividad de sialidasa. En diversos casos: el paciente es un paciente inmunodeprimido; el paciente padece una inmunodeficiencia primaria; el paciente inmunodeprimido sufre una inmunodeficiencia secundaria; el paciente inmunodeprimido está siendo o ha sido tratado con una terapia inmunosupresora; el paciente inmunodeprimido está siendo o ha sido tratado

40 con un agente quimioterapéutico; el paciente inmunodeprimido es un paciente trasplantado; la proteína comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % (95 %, 98 %) idéntica o completamente idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2; la proteína es DAS181; la composición comprende además uno o más compuestos adicionales; la administración se realiza mediante el uso de un inhalador de polvo seco; la administración es mediante el uso de un aerosol nasal; la administración es mediante el uso de un nebulizador; la administración se realiza

45 mediante el uso de un tubo endotraqueal (tubo ET) y un inhalador de polvo seco; la proteína comprende una sialidasa o una porción activa de la misma. En algunos casos: la sialidasa o porción activa de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a: sialidasa de *Actinomyces viscosus* o su dominio catalítico, sialidasa de *Clostridium perfringens* o su dominio catalítico, sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* o su dominio catalítico, sialidasa de *Micromonospora viridifaciens* o su dominio catalítico, sialidasa Neu2 humana o su dominio catalítico, o sialidasa Neu4 humana o su dominio catalítico; y en otros casos, la sialidasa o porción activa de la misma es al menos 90 % idéntica a la sialidasa de *Actinomyces viscosus* o su dominio catalítico.

En algunos casos: el péptido comprende un dominio de anclaje, en el que el dominio de anclaje es un dominio de unión a glicosaminoglicano (GAG) (por ejemplo, el dominio de unión a GAG es al menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico al dominio de unión a GAG del factor plaquetario humano 4, el dominio de unión a GAG de la interleucina 8 humana, el dominio de unión a GAG de la antitrombina III humana, el dominio de unión a GAG de la apoproteína E humana, el dominio de unión a GAG de la proteína migratoria angio-asociada humana, o el dominio de unión a GAG de la anfíregulina humana).

En algunos casos, el paciente tiene una función pulmonar insuficiente para hacer un uso eficaz del inhalador de polvo seco, o no puede usar ningún inhalador de polvo seco, por ejemplo pacientes con ventilador mecánico. En algunos casos, el paciente es un paciente inmunodeprimido infectado con PIV y se trata con una formulación líquida (por ejemplo, usando un nebulizador) o se trata con una formulación seca (por ejemplo, usando un inhalador de polvo seco).

En algunos casos, los pacientes inmunodeprimidos pueden incluir pacientes con neoplasias malignas, leucemias, enfermedades vasculares del colágeno, inmunodeficiencia congénita o adquirida, incluido el SIDA, receptores de trasplantes de órganos que reciben terapia inmunosupresora, y otros pacientes que reciben terapia inmunosupresora.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y figuras, y de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A continuación se describen estudios que muestran que DAS181, una proteína de fusión que tiene actividad de sialidasa, es eficaz contra aislados clínicos de PIV y en pacientes infectados por PIV. Diversas proteínas que tienen actividad de sialidasa se describen en la patente de EE.UU. nº 8.084.036; y DAS181 se describe en la patente de EE.UU. nº 7.807.174.

DAS 181 es una proteína de fusión que comprende un dominio catalítico de una sialidasa, y un dominio de anclaje. En algunos casos, la DAS181 aislada tiene una metionina amino terminal (Met), y en algunos casos no. Aquí, el término DAS181 se refiere a cualquier forma o a una mezcla de las dos formas, cuyas secuencias se proporcionan aquí como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:2. Varios de los ejemplos descritos aquí usan DAS 181 o composiciones que contienen DAS181.

DAS 181 y otras proteínas que tienen actividad de sialidasa, por ejemplo proteínas descritas en la patente de EE.UU. nº 8.084.036 o la patente de EE.UU. nº 7.807.174 se pueden incluir en composiciones farmacéuticas que se administran al aparato respiratorio en una formulación líquida o una formulación seca.

Las proteínas descritas aquí se pueden formular en composiciones farmacéuticas que incluyen diversos excipientes. En algunos casos, las formulaciones pueden incluir ingredientes activos adicionales que proporcionan efectos beneficiosos adicionales.

La presente invención incluye métodos que usan compuestos terapéuticos y composiciones que comprenden al menos una actividad de sialidasa. Las proteínas que son al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2 se encuentran entre las que pueden resultar útiles. En algunos casos, los aminoácidos que difieren de aquellos en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2 son sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas pueden definirse como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

- I. Restos pequeños, alifáticos, apolares o ligeramente polares: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly
- II. Restos polares cargados negativamente y sus amidas: Asp, Asn, Glu, Gln
- III. Restos polares cargados positivamente: His, Arg, Lys
- IV. Restos grandes alifáticos no polares: Met, Leu, Ile, Val, Cys
- V. Restos aromáticos grandes: Phe, Try, Trp

Dentro de los grupos anteriores, las siguientes sustituciones se consideran "altamente conservativas": Asp/Glu, His/Arg/Lys, Phe/Tyr/Trp, y Met/Leu/Ile/Val. Las sustituciones semiconservativas se definen como intercambios entre dos de los grupos (I)-(IV) anteriores que se limitan al supergrupo (A), que comprende (I), (II) y (III) anteriores, o al supergrupo (B), que comprende (IV) y (V) anteriores. Además, cuando se especifican aminoácidos hidrófobos en la solicitud, se refieren a los aminoácidos Ala, Gly, Pro, Met, Leu, Ile, Val, Cys, Phe, and Trp, mientras que los aminoácidos hidrófilos se refieren a Ser, Thr, Asp, Asn, Glu, Gln, His, Arg, Lys, y Tyr.

Las formas de dosificación o administración mediante nebulizadores generalmente contienen grandes cantidades de agua, además del ingrediente activo. También pueden estar presentes cantidades menores de otros ingredientes, tales como ajustadores de pH, emulsionantes o agentes dispersantes, conservantes, tensioactivos, o amortiguadores y otros agentes estabilizantes y solubilizantes.

Las formulaciones nasales se pueden administrar en forma de gotas, pulverizaciones, aerosoles, o mediante cualquier otra forma de dosificación intranasal. Opcionalmente, el sistema de administración puede ser un sistema de administración de dosis unitaria. El volumen de disolución o suspensión administrado por dosis puede ser cualquiera desde alrededor de 5 a alrededor de 2000 microlitros, desde alrededor de 10 a alrededor de 1000 microlitros, o desde alrededor de 50 a alrededor de 500 microlitros. Los sistemas de administración para estas diversas formas de dosificación pueden ser frascos cuentagotas, unidades exprimibles de plástico, atomizadores, nebulizadores, o aerosoles farmacéuticos, ya sea en paquetes de dosis unitarias o de dosis múltiples.

Las formulaciones líquidas de esta invención se pueden variar para incluir; (1) otros ácidos y bases para ajustar el pH; (2) otros agentes que imparten tonicidad, tales como sorbitol, glicerina y dextrosa; (3) otros conservantes antimicrobianos, tales como otros ésteres del ácido parahidroxibenzoico, sorbato, benzoato, propionato, clorbutanol, alcohol feniletílico, cloruro de benzalconio, y mercuriales; (4) otros agentes que imparten viscosidad, tales como carboximetilcelulosa sódica, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico y otras gomas; (5) potenciadores de la absorción adecuados; (6) agentes estabilizantes, tales como antioxidantes, como bisulfito y ascorbato, agentes quelantes de metales, tales como edetato de sodio, y potenciadores de la solubilidad de fármacos, tales como polietilenglicoles; y (7) otros agentes, tales como aminoácidos.

La invención incluye composiciones farmacéuticas líquidas que a diversos niveles de dosificación, tales como niveles de dosificación de DAS181 (u otro polipéptido que tenga actividad de sialidasa) están entre alrededor de 0,1 y alrededor de 10 mg. Ejemplos de tales niveles de dosificación incluyen dosis de alrededor de 0,1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 5 mg o 10 mg/día. Las dosis anteriores se pueden administrar una vez al día, durante un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días, diez días, once días, doce días, trece días, o catorce o más días. En diversos ejemplos descritos aquí, se trataron ratones con diversas dosis de las composiciones descritas aquí, incluidas dosis de 0,0008 mg/kg, 0,004 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,6 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 3,0 mg/kg, 4,0 mg/kg y 5,0 mg/kg.

Una "sialidasa" es una enzima que puede eliminar un resto de ácido siálico de una molécula sustrato. Las sialidasas (N-acilneuraminosilglicohidrolasas, EC 3.2.1.18) son un grupo de enzimas que eliminan hidrolíticamente restos de ácido siálico de sialo-glicoconjungados. Los ácidos siálicos son alfa-cetoácidos con cadenas principales de 9 carbonos que generalmente se encuentran en las posiciones más externas de las cadenas de oligosacáridos que están unidas a glicoproteínas y glicolípidos. Uno de los principales tipos de ácidos siálicos es el ácido N-acetylneuramínico (Neu5Ac), que es el precursor biosintético de la mayoría de los otros tipos. La molécula sustrato puede ser, como ejemplos no limitativos, un oligosacárido, un polisacárido, una glicoproteína, un gangliósido, o una molécula sintética. Por ejemplo, una sialidasa puede escindir enlaces que tienen uniones alfa(2,3)-Gal, alfa(2,6)-Gal, o alfa(2,8)-Gal entre un resto de ácido siálico y el resto de una molécula sustrato. Una sialidasa también puede escindir cualquiera o todas las uniones entre el resto de ácido siálico y el resto de la molécula sustrato. En la naturaleza se encuentran dos uniones principales entre Neu5Ac y el penúltimo resto de galactosa de las cadenas laterales de hidratos de carbono: Neu5Ac alfa (2,3)-Gal y Neu5Ac alfa (2,6)-Gal. Tanto las moléculas Neu5Ac alfa (2,3)-Gal como Neu5Ac alfa (2,6)-Gal pueden ser reconocidas por los virus de la gripe como el receptor, aunque los virus humanos parecen preferir Neu5Ac alfa (2,6)-Gal, los virus aviar y equino reconocen predominantemente Neu5Ac alfa (2,3)-Gal. Una sialidasa puede ser una sialidasa natural, una sialidasa modificada por ingeniería (tal como, pero sin limitación, una sialidasa cuya secuencia de aminoácidos se basa en la secuencia de una sialidasa de origen natural, incluyendo una secuencia que es sustancialmente homóloga a la secuencia de una sialidasa de origen natural). Como se usa aquí, "sialidasa" también puede significar la porción activa de una sialidasa de origen natural, o un péptido o proteína que comprende secuencias basadas en la porción activa de una sialidasa de origen natural.

Una "proteína de fusión" es una proteína que comprende secuencias de aminoácidos de al menos dos fuentes diferentes. Una proteína de fusión puede comprender una secuencia de aminoácidos que deriva de una proteína de origen natural o que es sustancialmente homóloga a toda o una parte de una proteína de origen natural, y además puede comprender de uno a un número muy grande de aminoácidos que derivan de o sustancialmente homólogos a toda o una porción de una proteína de origen natural diferente. En la alternativa, una proteína de fusión puede comprender una secuencia de aminoácidos que deriva de una proteína de origen natural o que es sustancialmente homóloga a toda o una parte de una proteína de origen natural, y además puede comprender de uno a un número muy grande de aminoácidos que son secuencias sintéticas.

Una "proteína de dominio catalítico de sialidasa" es una proteína que comprende el dominio catalítico de una sialidasa, o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente homóloga al dominio catalítico de una sialidasa, pero no comprende toda la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de sialidasa de la que deriva, en el que la proteína del dominio catalítico de sialidasa retiene sustancialmente la misma actividad que la sialidasa intacta de la que deriva el dominio catalítico. Una proteína del dominio catalítico de sialidasa puede comprender secuencias de aminoácidos que no derivan de una sialidasa, pero esto no es necesario. Una proteína de dominio catalítico de sialidasa puede comprender secuencias de aminoácidos que derivan de, o son sustancialmente homólogas a, secuencias de aminoácidos de una o más proteínas conocidas, o puede comprender uno o más aminoácidos que no derivan de, o no son sustancialmente homólogas, a secuencias de aminoácidos de otras proteínas conocidas.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de una composición o compuesto que se necesita para un efecto o respuesta terapéutico, profiláctico u otro efecto biológico deseado cuando una composición o compuesto se administra a un sujeto en una forma de dosificación única. La cantidad particular de la composición o compuesto variará ampliamente según condiciones tales como la naturaleza de la composición o compuesto, la naturaleza de la afección que se está tratando, la edad y el tamaño del sujeto.

"Tratamiento" significa cualquier manera en la que uno o más de los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad se mejoran o se modifican de otro modo de forma beneficiosa. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de la composición o compuesto aquí, tal como para reducir la mucosidad en el aparato respiratorio.

"Vías respiratorias" significa las vías respiratorias desde la nariz hasta los alvéolos pulmonares, incluidos la nariz, la garganta, la faringe, la laringe, la tráquea, y los bronquios, y también incluye los pulmones, y a veces los médicos se refieren a ellas como el sistema respiratorio.

5 "Inhalador" significa un dispositivo para administrar medicamentos en forma de aerosol o polvo seco que se inhala (se respira de forma natural o se fuerza mecánicamente hacia los pulmones) a través de la nariz o la boca, e incluye, sin limitación, un ventilador pasivo o activo. (mecánico con o sin tubo endotraqueal), nebulizador, inhalador de polvo seco, inhalador de dosis medidas, e inhalador de dosis medida presurizado.

"Inhalante" es cualquier sustancia que se inhala por la nariz o la boca.

10 "Excipiente", como se usa aquí, significa una o más sustancias o compuestos inactivos que, solos o en combinación, se usan como portador de los ingredientes activos de un medicamento. Como se usa aquí, "excipiente" también puede significar una o más sustancias o compuestos que se incluyen en una composición farmacéutica para mejorar sus efectos beneficiosos o que tienen un efecto sinérgico con el ingrediente activo.

EJEMPLOS

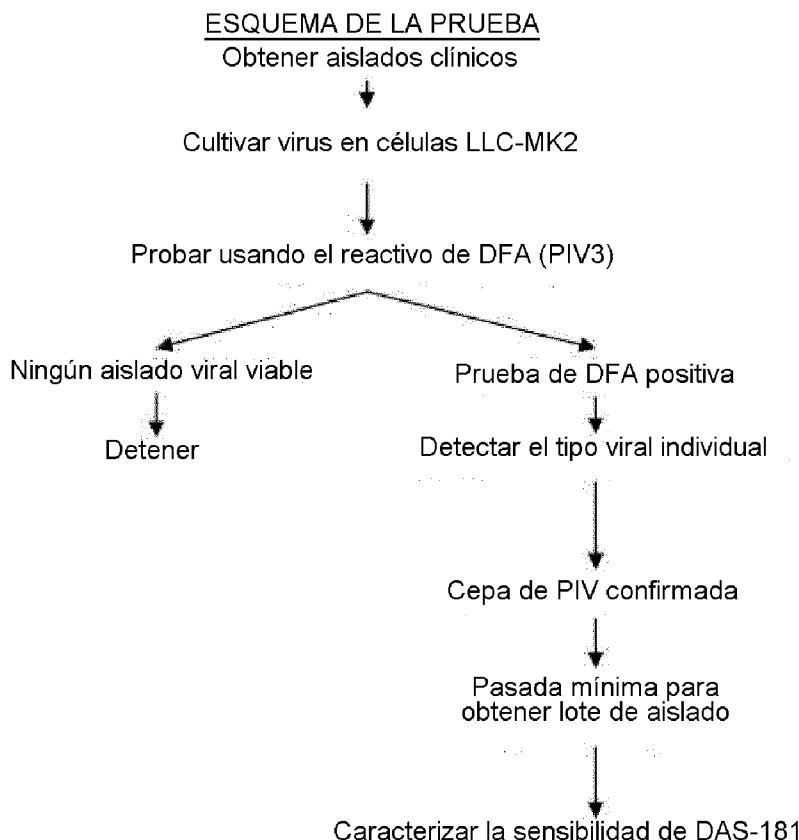
Ejemplo 1 - Aislado clínico

15 A continuación se describen estudios *in vitro* que demuestran que DAS 181 puede inhibir un aislado clínico de PIV. Los estudios son importantes debido a que los aislados clínicos de PIV se parecen más al PIV que infecta a los pacientes que a las cepas de PIV de laboratorio. La concentración eficaz requerida para inhibir la replicación viral en un 50% (EC50) establecida para este virus fue ~4 nM de DAS 181.

20 Los análisis de crecimiento viral también demostraron que sin DAS181, ya sea infectado a una MOI de 0,01 o 0,1, el virus progresó rápidamente a través de la monocapa del cultivo celular. En ambos casos, hacia el día 3 después de la infección, se observó un efecto citopático (CPE) y muerte celular significativos sin tratamiento con DAS181. Sin embargo, en presencia de DAS181 10 nM, la capa celular permaneció intacta durante todo el curso de la infección, y la liberación viral medida según ensayo de placas se redujo sustancialmente. En conjunto, estos datos indican que DAS 181 es eficaz contra este aislado clínico de PIV3, y protege contra la citotoxicidad inducida por virus y la muerte celular.

Diseño y resultados del estudio

30 Las muestras recibidas en hielo seco se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Cuando estuvieron listas para el análisis, las muestras se analizaron para detectar virus usando células LLC-MK2, y se evaluaron para detectar infección viral (tipo y cepa viral). Cuando se confirmó la infección, el virus se pasó 2 veces, hasta que la amplificación del lote viral fue suficiente. Se establecieron la caracterización de las propiedades de crecimiento del virus y las dosis inhibidoras eficaces de DAS 181.



Se usaron muestras (BAL y sobrenadante positivo de cultivo tisular) para la inoculación en células LLCMK2 después de una breve centrifugación a baja velocidad para eliminar las células y obtener sólo el sobrenadante. Se realizaron análisis de fluorescencia directa (DFA) para la identificación inicial de cualquier especie viral usando un filtro de DFA de virus respiratorio. El sobrenadante viral separado (0,02 o 0,2 ml) se inoculó sobre una placa de 6 pocillos con procedimientos de identificación y etiquetado adecuados.

5 El sobrenadante de los pocillos que contenían el inóculo viral inicial se colocó en múltiples pocillos de células recientes que contenían medio de crecimiento viral (VGM). Las células se monitorizaron para determinar el CPE como se describió anteriormente. Tres días después de la infección, se recogió un pocillo de cada aislado para el análisis DFA.

10 Las inoculaciones virales iniciales de células LLC-MK2 se monitorizaron para detectar CPE durante múltiples días (varían según la cepa viral y las propiedades de crecimiento). Se documentaron observaciones tales como la muerte celular, la formación de sincitios, el redondeo o agrandamiento de las células, y los cambios generales en el crecimiento celular. Aproximadamente 3-5 días después de la inoculación (o cuando las células presentan CPE), las células se congelaron a una temperatura entre -70 y -80°C, para permitir la liberación del virus. Después de la amplificación del virus en un recipiente de crecimiento más grande, el virus se congeló a entre -70 y -80°C para su almacenamiento a largo plazo.

20 Pasadas de muestras virales: Los pocillos duplicados del aislamiento inicial anterior se usaron para continuar el crecimiento del virus. Tras una lisis/muerte celular sustancial, el sobrenadante se transfirió a nuevas células. El virus de cada pasada del virus también se congeló a entre -70 y -80°C para preservar el lote viral. Para ampliar, el virus se pasa con células no infectadas hasta que se pueda obtener un volumen sustancial de virus de alto título. Para congelar el virus, se añade DMSO al 1%, y el virus se congela en alícuotas entre -70 y -80°C.

25 Confirmación de antígenos virales respiratorios: El análisis DFA inicial se usó para detectar la presencia de un patógeno viral respiratorio (incluyendo adenovirus, gripe A, gripe B, parainfluenza tipo 1, parainfluenza tipo 2, parainfluenza tipo 3, y virus sincitial respiratorio). Los análisis DFA se realizaron según las instrucciones del fabricante (nº de cat. 3137, Millipore, Temecula, CA). Tras un resultado positivo con la prueba de detección para indicar la presencia de antígeno viral respiratorio, la cepa viral se confirmó usando componentes del kit anterior que son específicos para cepas y subtipos virales individuales. Para el análisis de la cepa viral, las células se colocaron en portaobjetos (o se cultivaron en cubreobjetos de vidrio) para permitir un análisis apropiado, según las instrucciones del fabricante.

30 Identificación del aislado viral: Despues de la pasada del virus como se describe anteriormente, se realizó un análisis DFA confirmatorio en la muestra que produjo una infección productiva para confirmar el subtipo viral identificado. Se

realizó una confirmación continua a lo largo de estudios virales en diversos períodos de tiempo, lo que permitió monitorizar cambios en el tipo viral.

Congelación y organización de lotes virales: Una vez identificada y confirmada la cepa viral, los lotes virales se amplificaron a partir del aislado original, y se congelaron a -70°C en múltiples alícuotas para garantizar una pasada baja. Los procedimientos operativos estándar (SOP) y las modificaciones del ensayo de placas se realizaron como se describe a continuación. Se usó virus de pasada baja para todos los análisis posteriores, con el fin de mantener características (tanto fenotípicas como genotípicas) que sean lo más cercanas posible al aislado original.

Titulación de lotes virales: Los lotes de virus se titularon en monocapas de células LLC-MK2, y se analizaron entre los días 2 a 7 después de la infección fijándolos con glutaraldehído al 0,05 % o formaldehído al 4 % e incubando después con anticuerpos específicos del subtipo PIV y reactivos de DFA. Después de la tinción, las placas se contaron, y se determinó el título según los recuentos.

Inhibición de TCID50: Se sembraron células LLC-MK2 en una placa de 6 pocillos 1 día antes de la infección, a una densidad de 3×10^6 células/placa. Al día siguiente, las células se lavaron con 1X PBS una vez, y después se infectaron a la TCID50 identificada para el lote viral. 2 horas después de la infección, las células se cubrieron con agarosa que contenía concentraciones variables de DAS 181 que oscilaban de 1000 nM a 0,1 nM (diluciones en serie 10X). También se evaluó un control sin fármaco y un control no viral (NV). 3-5 días después de la infección (cuando las células exhibieron un efecto citopático sustancial), las células se fijaron y después se tiñeron con un anticuerpo específico para PIV2/3. Después de teñir con el anticuerpo, las placas se lavaron 3X con 1X PBS + Tween-20 al 0,05%. Después, las placas se tiñeron con el sustrato TBP/BCIP durante 10 a 15 minutos, o hasta que la tinción fuera visible. Se hicieron fotografías representativas, y se hicieron observaciones sobre la propagación del virus, así como el nivel de inhibición proporcionado por el tratamiento con DAS181.

Ensayo de reducción de placas: Se realizó un ensayo de reducción de placas (PRA) modificado, para determinar el nivel de DAS181 suficiente para inhibir la infección al 50% (EC50). Las células se sembraron el día antes de la infección a una densidad de 3×10^6 células/placa en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las células se lavaron con 1X PBS, y después se infectaron con ≤ 100 ufp/pocillo durante 2 horas. Después de las 2 horas iniciales, el medio se aspiró, y las células se lavaron nuevamente en 1X PBS. Las placas se cubrieron con agarosa en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) 2X (1: 1) que contiene una concentración apropiada de DAS 181 (1000 nM a 0,1 nM). Cada concentración de DAS 181 se analizó en pocillos duplicados, y los recuentos de placas resultantes se promediaron de los 2 pocillos. Se dejó que se formaran las placas durante 2 días, momento en el que las placas se fijaron con glutaraldehído al 0,05 % o formaldehído al 4 %. Después de la fijación, las placas se tiñeron con el anticuerpo apropiado o reactivo de DFA según las instrucciones del fabricante.

Curva de crecimiento viral (+/- DAS181) usando ensayo de placas: La liberación viral a lo largo del tiempo +/- DAS181 se evaluó sembrando células en una placa de 24 pocillos (3×10^6 células/placa) el día antes de la infección. Al día siguiente, las células se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) baja (entre 0,01 y 0,1), y 2 horas después de la infección, el medio se retiró y se repuso con medio nuevo con o sin DAS 181 a la concentración identificada necesaria para inhibir el virus. El sobrenadante viral se recogió cada 24 horas hasta que fue evidente una muerte celular de ~80-90% en los pocillos tratados con control, y entonces se repuso el medio que contenía DAS 181. El sobrenadante se congeló a -80°C, y después se evaluó el título viral para cada muestra mediante un ensayo de placas estándar para PIV. La propagación del virus también se evaluó usando este montaje experimental, excepto que las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio y después se fijaron y tiñeron como se describió anteriormente para el ensayo de reducción de placas.

Curva de crecimiento viral usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real: También se intentó el montaje del ensayo descrito anteriormente (sección 8.3) para la cuantificación viral mediante transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). El sobrenadante viral se recogió como se indicó anteriormente, y después se preparó el ARN. Se usó un volumen igual de sobrenadante viral como material de partida, y se añadió un ARN de control (GAPDH) a cada muestra para controlar las diferencias en la cantidad de ARN aislado de cada muestra debido a diferencias de purificación entre muestras. El ARN se analizó entonces en una reacción de RT-PCR de una sola etapa.

Inoculación inicial de muestras de PIV3: Los cultivos se inocularon con 0,02 o 0,2 ml de muestra del paciente (ya sea un BAL o un sobrenadante de cultivo tisular positivo previamente identificado). Se dejó que las células crecieran durante 5 días, y se observaron diariamente para detectar CPE u otro signo de infección viral. En los días 3 y 5 después de la infección, se hicieron fotografías, y se observó CPE en células inoculadas con el sobrenadante del cultivo tisular (Figura 1). Las muestras de BAL no produjeron una infección viral productiva, mientras que los sobrenadantes del cultivo viral mostraron signos de CPE tan pronto como 3 días después de la infección. Las células inoculadas con 0,2 ml de sobrenadante viral mostraron proporcionalmente más CPE que las células inoculadas con 0,02 ml. Hacia el día 5 después de la infección, las células infectadas con 0,2 ml de sobrenadante viral habían progresado sustancialmente, y exhibieron aproximadamente un 50 % de muerte celular, lo que indica propagación viral por todo el cultivo. La muestra inoculada con 0,02 ml de sobrenadante viral progresó más ese día, pero estaba sustancialmente menos infectada en comparación con la muestra inoculada con 0,2 ml. Las muestras de BAL todavía no mostraban signos de infección viral en ese momento. Observaciones adicionales (hasta el día 14) confirmaron que no se aisló ninguna infección viral productiva para esta muestra. La presencia de PIV3 se confirmó mediante el ensayo de DFA (Figura 2).

El control NV no muestra tinción positiva para el antígeno PIV3, mientras que la muestra de PIV3 infectada muestra que todas las células en el campo son positivas para PIV3.

Ensayo de placas para determinar el título: El PIV3 aislado de este paciente se pasó mínimamente en células LLC-MK2, y después se tituló usando un ensayo de placas modificado. Se probaron múltiples variaciones de este ensayo 5 estándar dado que este virus no formaba placas con tanta facilidad y consistencia como una cepa de referencia de PIV3. En comparación con los ensayos anteriores de placas con cepas de referencia de PIV, este virus tardó mucho más en producir placas que fueran visibles a simple vista cuando se tiñeron con los anticuerpos apropiados. Hacia el día 6 después de la infección, se podían visualizar las placas, aunque el tamaño de las mismas era variable, y muchas 10 todavía eran mucho más pequeñas. Hacia el día 7, las placas eran muy fáciles de visualizar, aunque todavía se notaba variación en el tamaño (datos no mostrados). En comparación, las cepas de referencia se visualizaron de manera fácil 15 y consistente usando este método el día 3 después de la infección. Para obtener resultados precisos y consistentes tanto con el ensayo de placas como con el ensayo de reducción de placas, ambos se modificaron para disminuir el tiempo de cultivo requerido para recuentos de placas consistentes, así como para aumentar la capacidad de visualizar placas más pequeñas que son inherentes a este aislado viral particular. El ensayo modificado se basa en el mismo principio que se describe para el ensayo de placas/ensayo de reducción de placas estándar. Sin embargo, debido a 20 que la formación de placas de PIV no requiere una gran superficie, se cambió el formato del ensayo para realizarlo en una configuración de placa de 24 pocillos. El virus se diluyó en serie (10-1-10-6), y pocillos duplicados se infectaron para el ensayo de placas, y entonces el virus se lavó y se cubrió con una mezcla de 2X MEM:Agarosa como se describe para el procedimiento normal de ensayo de placas. Se dejó que la infección progresara durante 48 horas, y entonces las células se fijaron y tiñeron usando el mismo reactivo de DFA usado para la identificación y confirmación del tipo viral (Figura 4).

Prueba de DAS181 del aislado clínico de PIV3: En el ensayo de reducción de placas estándar, se requirió tratamiento con DAS 181 durante un período prolongado, hasta 7 días, para que se desarrollaran placas visibles. La cantidad de DAS181 necesaria para inhibir el virus aumentó a medida que aumentaba el tiempo restante en cultivo a medida que 25 se perdía la actividad farmacológica en los pocillos. Este tiempo se consideró demasiado largo para lograr información inhibitoria consistente y precisa (Figura 5). Para el ensayo de reducción de placas modificado, el virus se diluyó para infectar células a 50 ufp/pocillo en VGM. Dos horas después de la infección, las placas se lavaron y se cubrieron con 2X VGM:Agarosa que contenía DAS181 diluida en serie (1000 nM-0,1 nM), o sin DAS181 para control. Se dejó que la 30 infección viral continuara durante 48 horas, y entonces las células se fijaron y tiñeron con el reactivo de DFA descrito anteriormente. En la Figura 6 se muestran placas representativas para cada dilución. El tamaño de las placas también 35 se redujo a medida que aumentó la concentración de DAS 181. Se muestran gráficos de los recuentos totales por dilución, y se indican los valores de EC50 para cada gráfico (Figura 7). El ensayo de reducción de placas se realizó 3 veces en tres días diferentes para garantizar valores de EC50 precisos a lo largo de múltiples días y pasadas. A partir de estos datos, el valor promedio de EC50 establecido para este virus es ~4 nM.

Inhibición por DAS 181 de TCID50 del aislado clínico de PIV3: Dado que DAS181 inhibió en gran medida la producción viral usando el ensayo de reducción de placas, también probamos la capacidad del fármaco para inhibir el virus en una mayor multiplicidad de infección. Para lograr esto, las células se infectaron a la TCID50 aproximada identificada para el aislado clínico de PIV3, y entonces se trataron con DAS181 diluida en serie (0,1-100 nM) 2 horas después de 40 la infección, y se cubrieron con agarosa. Cinco días después de la infección, las células se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo específico para PIV3. El antígeno viral se visualizó usando un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, y entonces se tiñó con un sustrato TBPCIP (Figura 8). El antígeno viral está representado con una mancha de color púrpura oscuro. Se observó inhibición de la infección viral entre 1-10 nM, mientras que las células tratadas con DAS 181 0,1 nM exhibieron una propagación viral similar a la del control sin fármaco. En apoyo del ensayo 45 de reducción de placas, estos resultados sugieren que la concentración inhibidora de DAS181 necesaria para limitar la propagación de la infección viral estaba entre 1-10 nM. Se observó formación de placas puntiformes en cada uno de los pocillos que se infectaron; sin embargo, la propagación se inhibió sustancialmente en todas las concentraciones analizadas de DAS 181 por encima de 0,1 nM.

Inhibición por DAS 181 de la propagación y liberación viral: Para cuantificar mejor la inhibición de la infección viral, se realizaron análisis de crecimiento viral. En primer lugar, la propagación viral se monitorizó durante todo el curso de la infección (72 horas) usando análisis DFA para monitorizar la propagación viral. Para hacer esto, las células se cultivaron en cubreobjetos de vidrio, y se infectaron a una MOI de 0,1. El virus se eliminó 2 horas después de la infección, y las células se trataron con DAS 181 (o se trataron de forma simulada con PBS), y entonces se analizó la 50 propagación viral cada 24 horas. Los cubreobjetos se tiñeron con el reactivo de DFA para PIV3, y se evaluó la presencia de infección viral. En todo momento después de la infección, el tratamiento con DAS 181 10 nM inhibió significativamente la propagación del virus (Figura 9). También se evaluaron las mismas células usadas en la Figura 9 para determinar la liberación viral a lo largo del tiempo. El sobrenadante del cultivo tisular se recogió cada 24 horas de los pocillos tratados con DAS181 o tratados de forma simulada, y entonces se congeló a -80°C hasta el análisis. El título viral (ufp/ml) se evaluó mediante un ensayo de placas como se describió anteriormente, y entonces se representó 55 gráficamente a lo largo del tiempo. La cantidad de virus liberado de las células tratadas con DAS 181 se redujo drásticamente con el tiempo (más de 2 logs) en comparación con las células no tratadas (Figura 10).

Para evaluar la liberación viral durante un curso más prolongado de infección, las células se infectaron a una MOI más baja (0,01), y después se evaluaron como se indicó anteriormente. Se observó una tendencia similar por cuanto las

células tratadas con DAS181 produjeron significativamente menos virus infeccioso durante el transcurso de la infección (Figura 11). Hacia el día 3 después de la infección, la infección viral en las células no tratadas había progresado sustancialmente, y todas las células presentaban CPE. Hacia el día 4 después de la infección, las células no tratadas comenzaron a morir (-50%), y hacia el día 6, los pocillos no tratados exhibieron una muerte celular de ~90-95%. En 5 las células tratadas con DAS181, no se observó CPE viral hasta el día 4 después de la infección, momento en el que un pequeño porcentaje de células mostró signos de infección viral (redondeo o muerte celular). Hacia el día 6 después de la infección, la infección viral se había extendido ligeramente, pero la mayoría de las células todavía estaban vivas y mostraban signos mínimos de CPE. La liberación viral también aumentó hacia el día 4 después de la infección en la muestra tratada con DAS181, aunque todavía fue considerablemente menor que en la muestra no tratada.

10 Conclusiones

DAS 181 inhibe eficazmente esta cepa clínica de PIV3 a todas las concentraciones entre 1-10 nM. La EC50 establecida fue ~4 nM, que es menor que la necesaria para inhibir la mayoría de las cepas de gripe que se han analizado en este ensayo. El tratamiento con DAS181 durante el curso de la infección en cultivo celular reduce eficazmente la liberación viral a lo largo del tiempo en más de 2 logs. La citotoxicidad y la muerte celular inducidas por la infección por PIV3 son 15 sustanciales hacia el día 3 después de la infección, cuando se infecta a una MOI baja. La modificación del ensayo de placas estándar y del ensayo de reducción de placas permite una mayor consistencia y viabilidad de estos ensayos. Estos datos amplían el conocimiento actual sobre la capacidad de DAS 181 para inhibir eficazmente diferentes aislados de PIV, y demuestran la inhibición por DAS181 de una cepa clínica de PIV.

Materiales y métodos

20 Células y virus: Las células LLC-MK2 originales se recibieron de ATCC (Manassas, VA), y se pasaron un mínimo de veces (menos de 4) para obtener múltiples viales de origen. Las células se descongelaron antes de recibir las muestras en cuestión, y se pasaron al menos 2 veces antes de la inoculación con la muestra de prueba.

Medio de mantenimiento de cultivo celular y crecimiento viral: Las células se dividieron cada 3-4 días, y se alimentaron 25 cada 2-3 días con Eagles-MEM (nº de cat. 11095-098, Life Technologies, Carlsbad, CA), 10% de FBS (nº de cat. 14-502F, Lonza, Riverside, CA), 1X Glutamax (nº de cat. 35050, GIBCO, Carlsbad, CA) y disolución antibiótica/antimicótica 1X (nº de cat. A5955, Sigma, St. Louis, MO). Las células se mantuvieron en medios abundantes según protocolos estándar, y se cultivaron a 37°C en una cámara humidificada que contenía 5 % de CO₂, a menos que se retiraran para mantenimiento o pruebas. Las células se lavaron con PBS (nº de cat. 14040, GIBCO, Carlsbad, CA), y se trispiraron usando TrypLE Express (nº de cat 12605-010, GIBCO, Carlsbad, CA). Los matraces individuales 30 de células se mantuvieron según protocolos estándar, y se etiquetaron con la fecha de la pasada, las iniciales del científico, el número de pasadas de la célula, y el nombre de las células. Las infecciones virales se realizaron en el aparato de prueba apropiado, incluidas placas de 6 o 24 pocillos (Corning, Lowell, MA), según lo definido por el experimento. Las células se mantuvieron en matraces de poliestireno (Corning, Lowell, MA) durante la amplificación antes de la infección. Los medios de crecimiento viral consistieron en E-MEM (mencionado anteriormente), 1X 35 Glutamax (mencionado anteriormente), 3,0 mg/ml de tripsina acetilada (nº de cat. T6763, Sigma) diluida hasta una concentración final de 3,0 µg/ml, y 1% de ITS (nº de cat. 41400, GIBCO, Carlsbad, CA). El medio de cubrimiento del ensayo en placa consistió en una mezcla 1:1 (vol:vol) de los medios E-MEM enumerados anteriormente (concentración 2X) y 1,8 % de Noble Agar (nº de cat. 10907, USB Corp., Cleveland, OH) en dH₂O para lograr una concentración final de medio 1X y 0,9 % de agarosa. El lote de DAS181 usado para estos estudios fue el lote n.º 20080715, preparado el 40 20 de enero de 2009 a una concentración de 25,5 mg/ml.

Extracción y amplificación de ARN: La extracción de ARN se realizó usando el kit de purificación de ARN viral QIAamp (nº de cat. 52904, Qiagen, Valencia, CA) o el kit de aislamiento de ARN total MagMAX™-96 (nº de cat. AM1830, Ambion, Foster City, CA), según las instrucciones del fabricante. La amplificación y cuantificación del ARN viral se intentó usando el kit TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (nº de cat. 4309169), según las instrucciones 45 del fabricante. Estos análisis se iniciaron, aunque se determinó que el formato de ensayo establecido actualmente no era fiable para estos estudios, y por lo tanto estos datos no se incluyeron en este informe.

Anticuerpos y reactivos de tinción: Para tinción de placas TCID50, se uso el anticuerpo αPIV2/3 (nº de cat. 20-PG90, Fitzgerald, Acton, MA), seguido de un anticuerpo secundario anti-cabra de burro (nº de cat. V1151, Promega, Madison, WI). La tinción con anticuerpos se visualizó usando el sustrato NBT/BCIP de 1 etapa (nº de cat. 34042, Thermo 50 Scientific, Rockford, IL).

Ejemplo 2 - Aislado clínico de PIV3

Diseño y resultados del estudio

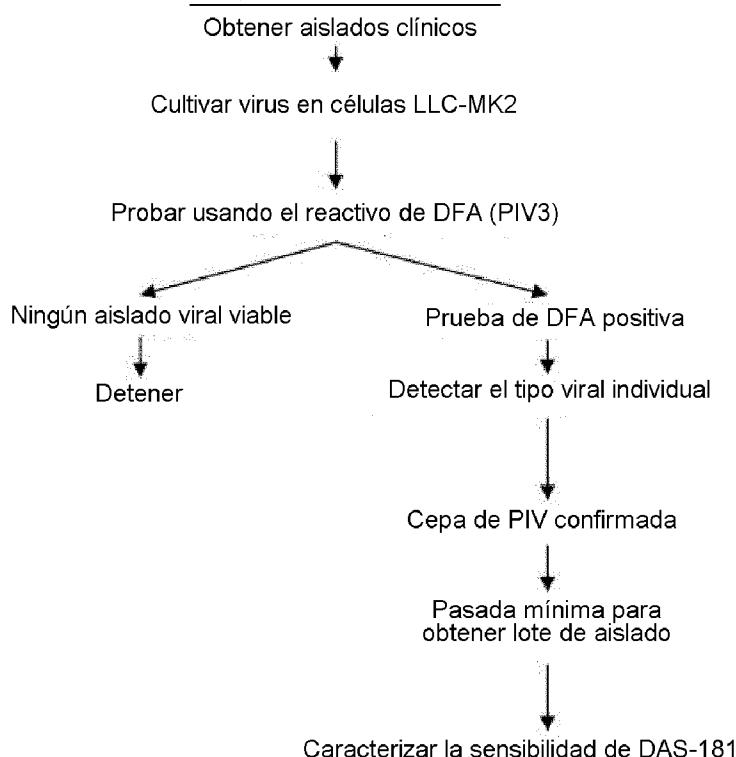
En un estudio separado, se estudió un segundo aislado clínico de PIV3. En comparación con las cepas de referencia (adaptadas en laboratorio), este aislado clínico creció más rápido en cultivo y formó placas que se propagaron 55 fácilmente por el cultivo en 24 horas. Este virus también alcanzó títulos muy altos, lo que indica que esta cepa particular de PIV3 es muy virulenta. La EC50 establecida para este virus es ~28 nM.

Los análisis de crecimiento viral también demostraron que sin DAS181, cuando se infecta a una MOI de 0,01, el virus progresó rápidamente por la monocapa del cultivo celular. Hacia el día 3 después de la infección, se observaron CPE y muerte celular significativos sin tratamiento con DAS181. Sin embargo, en presencia de DAS 181 100 nM, la capa celular permaneció predominantemente intacta durante todo el curso de la infección, y la liberación viral medida mediante ensayo de placas se redujo sustancialmente. En conjunto, estos datos indican que DAS 181 es eficaz contra este aislado clínico de PIV3, y protege contra la citotoxicidad inducida por virus y la muerte celular.

5 Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Cuando estuvieron listas para el análisis, las muestras se analizaron para detectar virus usando células LLC-MK2, y se evaluaron para detectar infección viral (tipo y cepa viral).

10 Cuando se confirmó la infección, el virus se pasó 2 veces, hasta que la amplificación del lote viral fue suficiente. Se establecieron la caracterización de las propiedades de crecimiento del virus y las dosis inhibidoras eficaces de DAS 181.

ESQUEMA DE LA PRUEBA



Inoculación de muestras clínicas: Se usaron muestras (hisopos nasales) para la inoculación en células LLC-MK2 después de una breve centrifugación a baja velocidad para eliminar las células y obtener sólo el sobrenadante. Sólo el hisopo nasal recolectado antes del tratamiento con DAS181 permitió una infección productiva. Se llevaron a cabo DFA para la identificación inicial de cualquier especie viral usando una prueba de DFA de virus respiratorio. El sobrenadante viral separado (0,02 o 0,2 ml) se inoculó sobre una placa de 6 pocillos con procedimientos de identificación y etiquetado adecuados. La presencia del antígeno PIV3 se probó con el reactivo de DFA específico para el tipo viral.

15 15 Aislamiento del inóculo inicial: El sobrenadante de los pocillos que contenían el inóculo viral inicial se colocó en múltiples pocillos de células recientes que contenían medio de crecimiento viral (VGM). Las células se monitorizaron para determinar el CPE como se señala anteriormente. Tres días después de la infección, se recogió un pocillo de cada aislado para DFA.

20 20 Amplificación viral: Las inoculaciones virales iniciales de células LLC-MK2 se monitorizaron para detectar CPE durante varios días. Se documentaron observaciones tales como la muerte celular, la formación de sincitios, el redondeo o agrandamiento de las células, y los cambios generales en el crecimiento celular. Aproximadamente 3-5 días después de la inoculación (o cuando las células presentan CPE), las células se congelaron a una temperatura entre -70 y -80°C, para permitir la liberación del virus. Después de la amplificación del virus en un recipiente de crecimiento más grande, se dividieron alícuotas del virus y se congelaron entre -70 y -80°C para su almacenamiento a largo plazo.

25 30 Confirmación de antígenos virales respiratorios: Se usó DFA inicial para detectar la presencia de un patógeno viral respiratorio (incluyendo adenovirus, gripe A, gripe B, parainfluenza tipo 1, parainfluenza tipo 2, parainfluenza tipo 3, y virus sincitial respiratorio). Los análisis DFA se realizaron según las instrucciones del fabricante (nº de cat. 3137, Millipore, Temecula, CA). Tras un resultado positivo con la prueba de detección para indicar la presencia de antígeno

viral respiratorio, la cepa viral se confirmó usando componentes del kit anterior que son específicos para cepas y subtipos virales individuales. Para el análisis de la cepa viral, las células se colocaron en portaobjetos (o se cultivaron en cubreobjetos de vidrio) para permitir un análisis apropiado, según las instrucciones del fabricante.

5 Congelación y organización de lotes virales: Una vez identificada y confirmada la cepa viral, los lotes virales se amplificaron a partir del aislado original, y se congelaron a -70°C en múltiples alícuotas para garantizar una pasada baja. Se usó virus de pasada baja para todos los análisis posteriores, con el fin de mantener características (tanto fenotípicas como genotípicas) que sean lo más cercanas posible al aislado original.

10 Titulación de lotes virales: Los lotes de virus se titularon en monocapas de células LLC-MK2 y se analizaron el día 2 después de la infección fijándolos con glutaraldehído al 0,05 % o formaldehído al 4 % e incubando después con reactivo de DFA específico del subtipo de PIV. Después de la tinción, las placas se contaron, y se determinó el título según los recuentos.

15 Inhibición de TCID50: Se sembraron células LLC-MK2 en una placa de 6 pocillos 1 día antes de la infección, a una densidad de 3×10^6 células/placa. Al día siguiente, las células se lavaron con 1X PBS una vez, y después se infectaron a la TCID50 identificada para el lote viral. 2 horas después de la infección, las células se cubrieron con agarosa que contenía concentraciones variables de DAS 181 que oscilaban de 1000 nM a 0,1 nM (diluciones en serie 10X). También se evaluó un control sin fármaco y un control no viral (NV). A los 3-5 días después de la infección (cuando las células presentaban CPE sustancial), las células se fijaron y después se tiñeron con el reactivo de DFA específico de PIV3. Después de teñir con el anticuerpo, las placas se lavaron 3X con 1X PBS + Tween-20 al 0,05%. Las placas se analizaron entonces para determinar la propagación viral. Se hicieron fotografías representativas, y se hicieron observaciones sobre la propagación del virus, así como el nivel de inhibición proporcionado por el tratamiento con DAS181.

20 25 30 Ensayo de reducción de placas: Se realizó un ensayo de reducción de placas (PRA) modificado, para determinar el nivel de DAS181 suficiente para inhibir la infección al 50% (EC50). Las células se sembraron el día antes de la infección a una densidad de 3×10^6 células/placa en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, las células se lavaron con 1X PBS, y después se infectaron con ≤ 100 ufp/pocillo durante 2 horas. Después de las 2 horas iniciales, el medio se aspiró, y las células se lavaron nuevamente en 1X PBS. Las placas se cubrieron con agarosa en EMEM 2X (relación 1: 1) que contiene una concentración apropiada de DAS181 (1000 nM a 0,1 nM). Cada concentración de DAS 181 se analizó en pocillos duplicados, y los recuentos de placas resultantes se promediaron de los 2 pocillos. Se dejó que se formaran las placas durante 2 días, momento en el que las placas se fijaron con glutaraldehído al 0,05 % o formaldehído al 4 %. Después de la fijación, las placas se tiñeron con el anticuerpo apropiado o reactivo de DFA según las instrucciones del fabricante.

35 Curva de crecimiento viral (+/- DAS181) usando ensayo de placas: La liberación viral a lo largo del tiempo +/- DAS181 se evaluó sembrando células en una placa de 24 pocillos (3×10^6 células/placa) el día antes de la infección. Al día siguiente, las células se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01, y 2 horas después de la infección, el medio se eliminó y se repuso con medio reciente con o sin DAS181 a la concentración identificada necesaria para inhibir el virus (100 nM). El sobrenadante viral se recogió cada 24 horas hasta que fue evidente una muerte celular de ~80-90% en los pocillos tratados con control, y entonces se repuso el medio que contenía DAS181. El sobrenadante se congeló a -80°C, y después se evaluó el título viral para cada muestra mediante un ensayo de placas.

40 45 Inoculación inicial de muestras de PIV3: Los cultivos se inocularon con 0,02 o 0,2 ml de muestra del paciente (ya sea un BAL o un sobrenadante de cultivo tisular positivo previamente identificado). Se dejó que las células crecieran durante 5 días, y se observaron diariamente para detectar CPE u otro signo de infección viral. El día 5 después de la infección, se hicieron fotografías, y se observó el CPE en células inoculadas con 0,2 ml de sobrenadante de cultivo tisular (Figura 12). Las células inoculadas con 0,2 ml de sobrenadante viral mostraron proporcionalmente más CPE que las células inoculadas con 0,02 ml, y por lo tanto estos pocillos continuaron para la propagación viral. Hacia el día 5 después de la infección, las células infectadas con 0,2 ml de sobrenadante viral habían progresado sustancialmente, y exhibieron aproximadamente un 50 % de muerte celular, lo que indica propagación viral por todo el cultivo. La muestra inoculada con 0,02 ml de sobrenadante viral progresó algo ese día, pero estaba sustancialmente menos infectada en comparación con la muestra inoculada con 0,2 ml.

50 Los cultivos virales inoculados se analizaron para detectar la presencia de un virus respiratorio, así como para detectar la presencia de PIV3 específicamente mediante DFA. Las células infectadas se aplicaron en un portaobjetos de vidrio y se tiñeron con anticuerpos que reconocían un panel de virus respiratorios o específicos para PIV3 (Figura 13).

55 Ensayo de placas para determinar el título: El PIV3 aislado de este paciente se pasó mínimamente en células LLC-MK2, y después se tituló usando un ensayo de placas modificado. En comparación con ensayos de placas de cepa de referencia de PIV anteriores y con otro aislado clínico de PIV3, este virus creció mucho más rápido y produjo placas que eran visibles a simple vista cuando se tiñeron con los anticuerpos/reactivo de tinción apropiados. Hacia el día 2 después de la infección, se pudieron visualizar las placas, y muchas se habían extendido significativamente en ese momento. El ensayo modificado usado para este virus se basa en el mismo principio que se describe para el ensayo de placas/ensayo de reducción de placas estándar. Sin embargo, debido a que la formación de placas de PIV no requiere una gran superficie, el formato del ensayo se realizó en una configuración de placa de 24 pocillos. El virus se

diluyó en serie (10-1-10-6), y pocillos duplicados se infectaron para el ensayo de placas, y entonces el virus se lavó y se cubrió con una mezcla de 2X MEM:Agarosa como se describe para el procedimiento normal de ensayo de placas. Se dejó que la infección progresara durante 36-48 horas, y entonces las células se fijaron y tiñeron usando el mismo reactivo de DFA usado para la identificación y confirmación del tipo viral (Figura 14). El título identificado del virus infeccioso producido a partir de esta inoculación fue 8×10^6 ufp/ml. Este es sustancialmente mayor (en comparación con 2×10^5 ufp/ml) que el otro aislado clínico de PIV3.

Prueba de DAS181 del aislado clínico de PIV3: Para el ensayo de reducción de placas, el virus se diluyó para infectar células a 50 ufp/pocillo en VGM. 2 horas después de la infección, las placas se lavaron y se cubrieron con 2X VGM:Agarosa que contenía DAS181 diluida en serie (1000 nM-0,1 nM), o sin DAS181 para control. Se dejó que la infección viral continuara durante 48 horas, y entonces las células se fijaron y tiñeron con el reactivo de DFA descrito anteriormente. El primer ensayo de reducción de placas realizado no arrojó valores de EC50 precisos, ya que la pérdida de infección viral dependiente de la dosis demostró un valor de EC50 más bajo en comparación con los gráficos de ensayos posteriores, y por lo tanto no se incluyó en el cálculo de EC50 promedio. Se determinó que debido a que las propiedades de crecimiento de este virus son muy diferentes a las de otras cepas de PIV3 probadas hasta ahora, este experimento inicial fue un caso atípico. Se realizaron tres ensayos diferentes de reducción de placas después de establecer las propiedades de crecimiento del virus, y se indican los valores de EC50 para cada experimento (Figura 15). Los ensayos de reducción de placas se realizaron 3 veces en tres días diferentes, para garantizar valores de EC50 precisos en múltiples días y pasadas. El valor promedio de EC50 establecido para este virus es ~28 nM.

Inhibición por DAS 181 de TCID50 del aislado clínico de PIV3: Dado que DAS181 inhibió en gran medida la producción viral usando el ensayo de reducción de placas, también probamos la capacidad del fármaco para inhibir el virus en una mayor multiplicidad de infección. Para lograr esto, las células se infectaron a la TCID50 aproximada identificada para el aislado clínico de PIV3, y entonces se trataron con DAS181 diluida en serie (0,1-1000 nM) 2 horas después de la infección, y se cubrieron con agarosa. 3 días después de la infección, las células se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo específico para PIV3 (Figura 16). El antígeno viral está representado en verde. Se observó inhibición de la infección viral entre 10-100 nM, mientras que las células tratadas con DAS181 0,1-1 nM exhibieron una propagación viral similar a la del control sin fármaco. En apoyo del ensayo de reducción de placas, estos resultados sugieren que la concentración inhibidora de DAS 181 necesaria para limitar la propagación de la infección viral estaba entre 10-100 nM. Se observó formación de placas puntiformes en cada uno de los pocillos que se infectaron; sin embargo, la propagación se inhibió sustancialmente en todas las concentraciones analizadas de DAS181 por encima de 1 nM. En los pocillos sin DAS181 o con DAS181 0,1 nM, la monocapa celular exhibió un CPE significativamente mayor en comparación con los pocillos tratados con concentraciones más altas con DAS181, lo que indica que DAS 181 también tiene un efecto protector con respecto a la citotoxicidad (datos no mostrados).

Inhibición por DAS 181 de la propagación y liberación viral: Para cuantificar mejor la inhibición de la infección viral, se realizaron análisis de crecimiento viral. En primer lugar, se monitorizó la propagación viral durante todo el curso de la infección (72 horas) usando DFA y un ensayo de placas para determinar las cantidades virales liberadas en el sobrenadante. Para hacer esto, las células se infectaron a una MOI de 0,01, y después se eliminó el virus 2 horas después de la infección y las células se trataron con DAS181 100 nM (o se trataron de forma simulada con PBS). Cada 24 horas, se monitorizó el CPE de las células, y el sobrenadante viral se recogió y se congeló para análisis de títulos posteriores. En todo momento después de la infección, el tratamiento con DAS181 100 nM protegió la monocapa celular de los efectos citotóxicos de la infección viral (datos no mostrados). La liberación viral también se inhibió durante el curso de la infección en ~1 log, aunque hacia el día 3 después de la infección los títulos virales (ufp/ml) liberados en el sobrenadante eran comparables (Figura 17). El día 3 después de la infección, las células que se trataron de forma simulada exhibieron aproximadamente un 95 % de muerte celular, como lo indica la caída en el título viral, mientras que en los pocillos tratados con DAS181 todavía sobrevivía aproximadamente un 70 % de la monocapa celular. Estos resultados explicarían por qué los títulos virales eventualmente se volvieron comparables en este ensayo, y probablemente se deba a la rápida progresión de la infección viral para este aislado en particular.

Conclusión

DAS 181 inhibe eficazmente esta cepa clínica de PIV3 a todas las concentraciones entre 10-1000 nM. La EC50 establecida fue 28 nM. El tratamiento con DAS181 durante el curso de la infección en cultivo celular reduce eficazmente la liberación viral con el tiempo en aproximadamente un log durante el ciclo de infección activa. La citotoxicidad y la muerte celular inducidas por la infección por PIV3 son sustanciales hacia el día 3 después de la infección cuando se infecta a una MOI baja y no se trata con DAS181, mientras que el tratamiento con DAS181 protege con éxito la monocapa celular frente a la citotoxicidad inducida por virus. Estos datos amplían el conocimiento actual sobre la capacidad de DAS 181 para inhibir eficazmente diferentes aislados de PIV, y demuestran además que DAS 181 es eficaz contra aislados clínicos de PIV3, incluso aquellos que se consideran las cepas más virulentas.

Materiales y métodos

Células y virus: Las células LLC-MK2 originales se recibieron de ATCC (Manassas, VA), y se pasaron un mínimo de veces (menos de 4) para obtener múltiples viales de origen. Las células se descongelaron antes de recibir las muestras en cuestión, y se pasaron al menos 2 veces antes de la inoculación con la muestra de prueba. Se inocularon muestras

que contenían PIV3 en las células LLC-MK2, y se pasaron 2 veces para obtener un gran volumen de sobrenadante viral. Se recogió sobrenadante viral que había sufrido mínimas pasadas en cultivo celular para mantener las características del virus.

5 Medio de mantenimiento de cultivo celular y crecimiento viral: Las células se dividieron cada 3-4 días, y se alimentaron cada 2-3 días con Eagles-MEM (nº de cat. 11095-098, Life Technologies, Carlsbad, CA), 10% de FBS (nº de cat. 14-502F, Lonza, Riverside, CA), 1X Glutamax (nº de cat. 35050, GIBCO, Carlsbad, CA) y disolución antibiótica/antimicótica 1X (nº de cat. A5955, Sigma, St. Louis, MO). Las células se mantuvieron en medios abundantes según protocolos estándar, y se cultivaron a 37°C en una cámara humidificada que contenía 5 % de CO₂, a menos que se retiraran para mantenimiento o pruebas. Las células se lavaron con PBS (nº de cat. 14040, GIBCO, Carlsbad, CA), y se trisnizaron usando TrypLE Express (nº de cat 12605-010, GIBCO, Carlsbad, CA). Los matraces individuales de células se mantuvieron según protocolos estándar, y se etiquetaron con la fecha de la pasada, las iniciales del científico, el número de pasadas de la célula, y el nombre de las células. Las infecciones virales se realizaron en el aparato de prueba apropiado, incluidas placas de 6 o 24 pocillos (Corning, Lowell, MA), según lo definido por el experimento. Las células se mantuvieron en matraces de poliestireno (Corning, Lowell, MA) durante la amplificación 10 antes de la infección. Los medios de crecimiento viral consistieron en E-MEM (mencionado anteriormente), 1X Glutamax (mencionado anteriormente), 3,0 mg/ml de tripsina acetilada (nº de cat. T6763, Sigma) diluida hasta una concentración final de 3,0 µg/ml, y 1% de ITS (nº de cat. 41400, GIBCO, Carlsbad, CA). El medio de cubrimiento del ensayo en placa consistió en una mezcla 1:1 (vol:vol) de los medios E-MEM enumerados anteriormente (concentración 15 2X) y 1,8 % de Noble Agar (nº de cat. # 10907, USB Corp., Cleveland, OH) en dH₂O para lograr una concentración 20 final de medio 1X y 0,9 % de agarosa. El lote de DAS181 usado para estos estudios fue el lote n.º 20080715, preparado el 20 de enero de 2009 a una concentración de 25,5 mg/ml.

Anticuerpos y reactivos de tinción: Para la tinción de placas de TCID50, se usó un kit de análisis de anticuerpos por fluorescencia directa (nº de cat. 3137, Millipore, Temecula, CA) según las instrucciones del fabricante.

25 Los Ejemplos 3-10 a continuación describen los resultados de un subconjunto de pacientes con EIND tratados con DAS 181 usando un nebulizador y una formulación líquida de DAS181 o un inhalador de polvo seco y una formulación seca de DAS181.

Ejemplo 3 - Tratamiento del Paciente 1 con DAS181 nebulizada

30 Se inició el tratamiento con DAS181 para un bebé (niña) de 18 meses con diagnóstico de infección por PIV3. A este bebé también se le diagnosticó concomitantemente leucemia linfoblástica aguda (ALL). El plan de dosificación conservativo inicial se redactó basándose en los datos de toxicología animal existentes. Debido a la edad del paciente, el medicamento sólo pudo administrarse en forma nebulizada. El nebulizador usado en este caso se describe en la Tabla 1.

Tabla 1: Características del nebulizador

Nebulizador	Aerogen Pro X
MMAD	2,1 µm
Fracción de partículas finas (FPF, 1-5 µm)	68,2%
Producción media	0,35 ml/min a un caudal de 6 a 60 l/min.

35 El plan de dosificación inicial se ideó mientras el paciente estaba intubado. Se recomendó comenzar con una dosis de 2 min según la información toxicológica disponible. Con una producción de 0,35 ml/min, la velocidad respirable (1-5 µm) fue 0,24 ml/min, correspondiente a 0,16 mg de DAS181/min administrados. Para una dosis de 2 min, se proyectó que se administrarían 0,32 mg de aerosol respirable de DAS181 (se administraría un total de 0,46 mg de DAS181).

Plan de dosificación de seguimiento:

40 Si no se observaron síntomas de efectos adversos y la paciente estaba clínicamente estable, la duración de la nebulización se aumentó a 4 min, y los síntomas se monitorizaron nuevamente durante los dos días siguientes.

Después de los tres días iniciales de dosificación, la carga viral de PIV disminuyó sustancialmente según lo medido mediante PCR cuantitativa específica para PIV3. Inicialmente se determinó que la paciente tenía una carga viral muy alta (10^9 copias/ml en el aspirado traqueal), y este nivel cayó más de 5 logs (hasta 10^4 copias/ml) dos días después del último día de administración. Sin embargo, la paciente tuvo un rebote en la carga viral después de que se suspendió la dosis inicial, lo que indica que las dosis iniciales no fueron suficientes para eliminar la infección. Durante este tiempo, la paciente mejoró clínicamente, mostrando radiografías de tórax ligeramente más claras. También se observó una mejora en el soporte ventilatorio después de estas dosis iniciales de DAS 181. Debido a la falta de eliminación del virus, así como al estado clínico de la paciente, se recomendó continuar dosificando al paciente con DAS 181.

La paciente se dosificó nuevamente durante 4 minutos. Se observó una leve mejoría clínica, pero la paciente aún dio positivo para PIV tanto en las evaluaciones cualitativas de DFA como en las de PCR cuantitativa. Se administró a la paciente la quinta dosis de DAS 181. El estado clínico de la paciente continuó mejorando, y la paciente se extubó después de 5 dosis.

- 5 Aunque hubo una mejoría clínica, la carga viral de PIV de la paciente sólo disminuyó ligeramente (~1 log) después de las dosis únicas intermitentes de DAS 181. Se recomendó tratar a la paciente con otro ciclo de DAS 181. El plan de dosificación se revisó ligeramente debido a que la paciente se extubó como se describe anteriormente.

En niños más pequeños no intubados, una mascarilla facial es la forma más fácil de administrar un fármaco nebulizado en lo que respecta al cumplimiento, la facilidad de uso y la comodidad del paciente. Para estimar la dosis adecuada, 10 se consideró la pérdida del fármaco en las cavidades bucal y nasal, así como la eficacia de la administración usando la mascarilla facial. Se requirió una dosis más grande para compensar la pérdida de eficiencia en la administración.

15 Los datos de desarrollo del polvo seco de DAS181 con un tamaño de partícula de 3 a 5 μm demostraron que aproximadamente 30 a 35 % del fármaco administrado se depositará en la cavidad bucal y la orofaringe. Los datos de la bibliografía también muestran que la deposición pulmonar es alrededor de 48% de la dosis emitida cuando se usa un nebulizador y una mascarilla facial en niños en una situación ideal. Cabe señalar que la bibliografía sobre el depósito de fármacos en los pulmones de un bebé varía considerablemente, y depende en gran medida del caudal, la cooperación del bebé, el ajuste/diseño de la mascarilla, y el tiempo de dosificación. Tomando en conjunto los factores que contribuyen a la eficiencia de la administración, se esperaba una reducción de al menos 50% en la eficiencia de la administración. En base a esto, se recomendó comenzar con 8 minutos de dosificación usando el nebulizador 20 estándar con la configuración de mascarilla facial. El tiempo de dosificación adicional representó la pérdida potencial en la cavidad oral/nasal y en la configuración de la mascarilla facial en comparación con la dosificación al paciente mientras estaba intubado. No hubo cambios en la preparación de la disolución de dosificación. Para una dosis de 8 minutos, se esperaba que se administraran 1, 8 mg de DAS181 en total, y se esperaba que 1,25 mg de DAS181 estuviera en forma respirable.

- 25 25 La paciente se trató con cinco (8 minutos) dosis una vez al día de DAS 181. Después de esta ronda de dosificación, la carga viral de PIV3 volvió a caer sustancialmente (más de 3 logs), como lo demuestra la evaluación cuantitativa de la carga viral en muestras de lavado nasal tomadas de la paciente inmediatamente antes de cada dosis, y en los días siguientes a la dosificación. La reducción de la carga viral continuó disminuyendo durante 5 días después de la última dosis, como se muestra en la Figura 18 (los días de dosificación se indican en rojo), y continuó disminuyendo mucho 30 después de la dosificación. Finalmente, la paciente fue dado de alta del hospital, y la carga viral cayó a indetectable.

35 Los resultados de este caso demuestran un método de administración viable de la disolución nebulizada de DAS 181 tanto a un paciente intubado como a un paciente que usa una mascarilla facial. El plan de dosificación estimado fue preciso, y se administró una cantidad comparable de DAS181 con ambos métodos. Además, estos datos respaldan el uso de DAS181 en bebés pequeños, lo que demuestra la seguridad, la administración eficaz del medicamento, y los efectos antivirales del medicamento cuando se usa con este método de administración.

Ejemplo 4 - Tratamiento del Paciente 2 con DAS181 nebulizada

40 El paciente era un hombre de 61 años que se había sometido a un trasplante de células madre de sangre periférica para la AML. El curso posterior al trasplante se complicó por EICH cutánea, neumonía por VRS, nódulos pulmonares de etiología incierta y un episodio de síntomas vesicales que se cree que se deben a EICH, por lo que fue tratado con esteroides. Al año siguiente acudió a un hospital externo con tos, disnea y dolor torácico. Se sometió a un BAL, comenzó a tomar cidofovir por una posible neumonía por adenovirus, y fue trasladado a un hospital el 1 de julio con insuficiencia respiratoria progresiva. Se encontró adenovirus en sangre (86.000 copias/ml), y tenía adenovirus (Ct=38,4) y PIV-3 (Ct=32,3) en una muestra nasofaríngea mediante PCR. Se continuó con cidofovir (1 mg/kg, 3 veces por semana). Se intubó, en cuyo momento un BAL no mostró adenovirus ni otros patógenos pero fue positivo para 45 PIV-3 por DFA y por PCR (Ct=18,8). Su condición se estaba deteriorando gradualmente, con una creciente necesidad de asistencia respiratoria (FIO₂ = ~90 %, 10 mm PEEP) antes del tratamiento. Un aspirado traqueal fue positivo para PIV3, con un Ct = 13, presumiblemente una carga viral muy alta.

50 DAS181 debía administrarse mediante un nebulizador en línea una vez al día. La concentración de DAS181 en la disolución debía ser 1,29 mg/ml. El día 1, se debían administrar 1,5 ml, mientras que el día 2 se debía aumentar la dosis a 2,5 ml. En los días 3-5, la dosis recomendada estaba entre 2,5 ml-5 ml, escogiéndose la dosis final en función de la respuesta clínica del paciente. Se debían realizar cargas virales diarias, análisis de laboratorio y observaciones clínicas.

55 Después de un día de tratamiento con DAS 181 nebulizada (1,5 ml), el paciente toleró bien el fármaco, y la carga viral disminuyó aproximadamente 1 log. A una velocidad de producción de 0,35 ml/min, esta cantidad se dosificó en aproximadamente 4 min. La dosis generada fue aproximadamente 1,3 mg de DAS181 en el intervalo respirable.

Después de la segunda dosis (2,5 ml, 2,2 mg de DAS181 en el intervalo respirable), el paciente seguía vivo y se documentó que estaba ligeramente mejor, ya que su oxigenación mejoró levemente (0,9 FiO₂ y 10 de PEEP con sats de 93 % en lugar de 1,0, y 12 con sats de 88-90 %) y su distensibilidad pulmonar mejoró (volumenes corrientes de

430 con control de presión 18 en comparación con 380 con control de presión 20). Su radiografía de tórax continuó teniendo infiltrados difusos, pero pueden haber sido menos denso en la parte superior de los pulmones bilateralmente. La carga viral disminuyó más de un log después de dos dosis, como se muestra a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Día de dosificación	Carga viral (copias de ARN viral/ml)
Pretratamiento	$6,27 \times 10^{10}$
Día 1 post-dosis	$9,41 \times 10^9$
Día 2 post-dosis	$1,96 \times 10^9$

- 5 Después de la segunda dosis de DAS181, la familia del paciente decidió que deseaba retirar todas las medidas de soporte vital. Por tanto, no se administraron dosis adicionales de DAS 181.

Ejemplo 5 - Tratamiento del Paciente 3 con DAS181 nebulizada

Esta paciente era una mujer de 47 años que fue evaluada por posible neumopatía intersticial. A esta paciente se le diagnosticó posible neumonitis por hipersensibilidad, y se le trató con esteroides. La paciente ingresó con insuficiencia respiratoria. Un BAL obtenido de esta paciente fue positivo para PIV-3 mediante PCR cualitativa (panel viral respiratorio). Todas las demás pruebas diagnósticas fueron negativas. En esta paciente se observó neumonitis difusa, y estaba en ECMO para oxigenación.

10 15 La dosis propuesta para esta paciente fue la administración de DAS 181 mediante nebulizador, debido al deterioro del estado de la función pulmonar de la paciente. La primera dosis iba a ser de 1,5 ml de disolución madre de DAS181 con una concentración de 1,3 mg/ml, para una dosis total de 1,3 mg de DAS181 en el intervalo respirable. La segunda dosis debía aumentarse a 2,5 ml según el estado de la paciente, y las lecturas de laboratorio (2,5 ml de la disolución madre equivalen a 2,2 mg de DAS181 en el intervalo respirable). La dosis entre los días 3-5 debía estar entre 2,5-5,0 ml. El sistema nebulizador Aerogen Pro-X debía usarse según las instrucciones del fabricante y la recomendación del centro clínico.

20 25 Después de 5 días de administración de DAS181, la paciente permaneció en ECMO durante gran parte del tratamiento. Su radiografía de tórax pareció mejorar después de las primeras 3 dosis. Se sospechó que se estaba produciendo algún síndrome disneico agudo (SDRA), y se concluyó que múltiples factores contribuían a su mal estado pulmonar. Después de completar el ciclo de tratamiento, se retiró la ECMO a la paciente y parecía poder respirar usando oxígeno suplementario mediante una mascarilla facial, una mejora notable en el estado clínico del paciente.

La Tabla 3 resume los resultados de laboratorio obtenidos de esta paciente. Los resultados de virología se obtuvieron de muestras de hisopos de garganta recolectadas del sujeto inmediatamente antes de la dosificación cada día (2 hisopos inoculados en 3 ml de medio de transporte viral estándar Copan).

Tabla 3

Día de dosificación	Dosis recibida	Carga viral de PIV3
Día 1	1,5 ml	8100
Día 2	2,5 ml	20100
Día 3	2,5 ml	6350
Día 4	2,5 ml	BLQ
Día 5	2,5 ml	BLQ
Día 6 (1 día después de la dosis)	Ninguna	No probado

La Figura 19 muestra los datos presentados en la tabla anterior.

Ejemplo 6 - Tratamiento del Paciente 4 con DAS181 nebulizada

El paciente 4 era un varón de 7 meses con una enfermedad subyacente de SCIDS (T-/B+NK-) complicada con GVHD después de un trasplante de médula ósea, que presentaba una infección persistente por PIV3. La infección por PIV3 persistió durante aproximadamente 6 semanas antes del tratamiento con DAS181, y el paciente tuvo necesidades persistentes de oxígeno durante todo el proceso. El paciente progresó hasta necesitar ventilación mecánica, y también 30 35 se le diagnosticó neumonía, que fue tratada con un tratamiento de 21 días con esteroides y antibióticos. El paciente recibió IGIV, pero la infección por parainfluenza persistió. El paciente se extubó, aunque permaneció persistentemente

hipóxico con radiografías de tórax anormales, requiriendo suplementación persistente de oxígeno. El paciente recibió un autotrasplante de médula ósea, y enfermó cada vez más después de recibir inmunosupresión para la EICH después del trasplante de médula ósea. La infección por PIV3 se confirmó antes del tratamiento con DAS181 mediante PCR con matriz de películas respiratorias. Además, PIV3 se confirmó mediante análisis de fluorescencia directa (DFA).

- 5 Se recomendó un ciclo inicial de 5 días de polvo seco disuelto de DAS 181 administrado mediante nebulizador, con la opción de un ciclo de tratamiento de seguimiento de 5 días adicionales de dosificación. Se otorgó la aprobación de la FDA para este EIND. El fármaco se administró mediante mascarilla con un nebulizador Aeroneb.

10 La primera dosis de DAS181 (1,5 ml; 1,9 mg de DAS 181) se administró sin efectos adversos. Posteriormente, se administraron las siguientes cuatro dosis (1,5 ml; 1,9 mg de DAS 181). Durante los primeros cinco días de administración, el paciente comenzó a mostrar signos modestos de mejoría clínica. Se presentaron crepitantes en los pulmones, pero se resolvieron cuando se administró la tercera dosis de DAS 181. Sin embargo, el paciente permaneció sintomático durante los primeros cinco días de la administración, con necesidad continua de oxígeno suplementario (4-6 litros a través de una cánula nasal de alto flujo). No se observaron efectos adversos relacionados con el fármaco del estudio durante todo el tratamiento. Los médicos recomendaron continuar el tratamiento con DAS 181 durante una ronda adicional de dosificación.

15 Se administraron cuatro dosis adicionales de DAS181 (1,5 ml, 1,9 mg de DAS 181) mediante mascarilla. Debido a los aumentos en los niveles de fosfatasa alcalina, DAS 181 se administró en días alternos durante las últimas 3 dosis del tratamiento con DAS 181. Durante este curso de tratamiento, el paciente pareció exhibir una mejora clínica sustancial. Los requerimientos de oxígeno suplementario comenzaron a mejorar, cayendo a sólo 0,5 l/min al final del tratamiento. También se informó que la función pulmonar mejoró sustancialmente, tanto mediante radiografía de tórax como mediante observación general. El paciente también experimentó una reducción de la tos durante el tratamiento, y los patrones respiratorios del paciente se volvieron más normales.

20 25 Los resultados de la carga viral de este paciente se obtuvieron a partir de la evaluación mediante DFA (semicuantitativa) y mediante qPCR (cuantitativa). Las muestras nasofaríngeas debían analizarse diariamente mediante qPCR, y según fuera necesario, mediante DFA. La Tabla 4, a continuación, resume los resultados de carga viral obtenidos de cada evaluación. La lectura de DFA se mide entre negativa (no se observa infección) y 4+ (el 100% de las células en el campo son positivas para PIV). El resultado de qPCR mide copias de ARN/ml. Para ambas evaluaciones se usaron hisopos nasofaríngeos.

Tabla 4

Fecha	Resultado del DFA	Resultado de la qPCR
Día 1 (valor inicial (antes de la dosis 1))	4+	$5,44 \times 10^5$
Día 2 (antes de la dosis 2)	Sin datos	$6,61 \times 10^6$
Día 3 (predosis 3)	Sin datos	$6,14 \times 10^7$
Día 4 (predosis 4)	2-3+	$8,48 \times 10^7$
Día 5 (predosis 5)	Sin datos	$7,53 \times 10^7$
Día 6 (predosis 6)	Sin datos	$7,38 \times 10^6$
Día 7 (predosis 7)	2-3+	$1,40 \times 10^8$
Día 8 (predosis 8)	1+	$7,50 \times 10^6$
Día 9 (sin dosis administrada)	Traza a 1+	$3,00 \times 10^7$
Día 10 (predosis 9)	1+	$4,93 \times 10^6$
Día 12 (sin dosis administrada)	Raro/Trazas	$1,03 \times 10^8$
Día 14 (sin dosis administrada)	Negativo	Sin datos

30 35 En general, el paciente mostró una marcada mejoría clínica durante todo el tratamiento, sin que se informaran efectos adversos del fármaco, aparte del aumento observado de la fosfatasa alcalina. Los resultados virológicos fueron algo divergentes, por cuanto la evaluación de DFA mostró una reducción sustancial de la infección viral, lo que llevó a un resultado de DFA negativo al final del tratamiento. Sin embargo, los resultados de la qPCR indican que el virus todavía estaba presente en las muestras al final del tratamiento. Se desconoce en este momento por qué los resultados son diferentes. Es posible que los resultados discrepantes se deban al hecho de que la evaluación de DFA mide las células intactas infectadas activamente, mientras que la PCR mide todo el ARN viral presente en la muestra, ya sea infeccioso o no.

Ejemplo 7: Tratamiento del Paciente 5 con DAS181 en forma de polvo seco

El paciente 5 era un hombre de 59 años con antecedentes de enfermedad de Crohn, diabetes mellitus y enfermedad pulmonar intersticial, que se sometió a trasplante de pulmón izquierdo. Se mantuvo con un régimen de inmunosupresión de mantenimiento crónico de tacrolimus, micofenolato mofetilo, y prednisona 5 mg al día, además de un tratamiento mensual con adalimumab para su enfermedad de Crohn grave. Su evolución posterior al trasplante se complicó por broncomalacia y varias infecciones del aparato respiratorio, incluida la neumonitis por virus respiratorio sincitial (VSR) y la neumonía por *Klebsiella*. Regresó casi a su nivel inicial después de estas infecciones respiratorias.

Desarrolló fiebres, escalofríos, y esputo purulento que llevaron a su hospitalización. Su fiebre disminuyó, y su esputo purulento se resolvió con terapia empírica con vancomicina, ceftazidima, y levafleroxina; sin embargo, su disnea de esfuerzo, sibilancias, y tos mejoraron lentamente. Estaba afebril, pero necesitaba 2 litros de oxígeno, y presentaba sibilancias y crepitantes en el examen pulmonar. Se realizó una tomografía computarizada de tórax, que mostró infiltrados de aspecto inflamatorio en su lóbulo inferior izquierdo. Continuó recibiendo vancomicina, ceftazidima, y levafleroxina. Le hicieron una broncoscopia, y se observó que tenía secreciones amarillentas. Su muestra de lavado broncoalveolar (BAL) dio positivo para parainfluenza-3 (PIV3) mediante PCR cualitativa; todos los demás cultivos y estudios virales no fueron reveladores.

El régimen posológico propuesto es de 10 mg de DAS181 durante 3 a 5 días, dependiendo de la respuesta y los efectos adversos. El medicamento debía administrarse mediante un inhalador de polvo seco, y podría justificarse un ciclo de tratamiento adicional según la sintomatología y la seguridad. Se debían recolectar hisopos nasofaríngeos diariamente para determinar la carga viral cuantitativa de PIV-3. También se debían realizar laboratorios diarios (incluidos hemograma completo, química completa, pruebas de función hepática, PT, y PTT). También se debían realizar pruebas de función pulmonar basales y diarias.

Los signos vitales obtenidos inmediatamente antes del tratamiento indicaron que el paciente requirió 2 litros de O₂ suplementario mediante cánula nasal. Las pruebas de función pulmonar obtenidas antes de la administración de su primera dosis de DAS181 demostraron un FEV1 de 1,52 litros y una FVC de 1,70 litros.

Se recolectaron las siguientes muestras antes de cada dosis: un hisopo nasofaríngeo (N/P) y un lavado orofaríngeo (OP) para monitorizar la diseminación viral, y muestras de sangre para analizar los niveles de DAS 181. El In-Check DIAL se usó para el entrenamiento de inhalación. Después de un entrenamiento satisfactorio adicional en la técnica de inhalación con el Cyclohaler y una cápsula vacía, se administró DAS181 a través del Cyclohaler. El paciente no tuvo reacciones inmediatas a la administración de DAS181.

El paciente recibió tratamiento durante 5 días consecutivos sin experimentar ningún evento adverso evidente. Mejoró clínicamente durante el ciclo de tratamiento desde el punto de vista respiratorio y sistémico. Al segundo día de tratamiento, se sintió menos disneico, y su tos se volvió más seca. Hacia el último día de tratamiento, se sintió nuevamente a alrededor del 90% de su valor inicial en términos de energía y respiración. Al día 6 de iniciar DAS181, se realizó una broncoscopia, y el líquido del BAL volvió a ser positivo para PIV3, con carga viral de 3,50E+07.

El paciente fue dado de alta a su domicilio dos días después de completar el tratamiento con DAS181. Todos sus signos vitales después del tratamiento mostraron una mejoría, y cuando lo contactamos por teléfono 2 semanas después del tratamiento, informó que se sentía bien y no tenía signos de recaída. Su tolerancia al ejercicio había vuelto a su nivel inicial antes de su enfermedad. En general, el paciente también mejoró en cuanto a sus necesidades de oxígeno al finalizar el tratamiento.

Se enviaron hisopos nasofaríngeos y muestras de lavado orofaríngeo para pruebas de carga viral de PIV3. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Día posterior a la dosis	Copias de PIV en hisopo NF/ml	Copias de PIV en lavado OF/ml
Día 1 (predosis 1)	$7,87 \times 10^5$	$5,39 \times 10^4$
Día 2 (predosis 2)	$1,46 \times 10^5$	$2,63 \times 10^5$
Día 3 (predosis 3)	$7,77 \times 10^6$	$3,46 \times 10^4$
Día 4 (predosis 4)	$8,87 \times 10^7$	$2,67 \times 10^4$
Día 5 (predosis 5)	$1,45 \times 10^5$	$1,73 \times 10^6$
Día 6 (+1) (1 día después de la dosis 5)	$2,01 \times 10^4$	$4,41 \times 10^5$
Día 7 (+2) (2 días después de la dosis 5)	$2,56 \times 10^4$	$2,20 \times 10^3$

Hubo cierta variabilidad diaria en las medidas cuantitativas de la carga viral de PIV3, posiblemente debido a diferencias en las técnicas de recogida de muestras por parte de diferentes proveedores y a la exquisita sensibilidad del ensayo

en sí a pequeñas variaciones en los viriones en la muestra. Los datos sugieren una caída de ≥ 1 log en la carga viral, independientemente del tipo de muestra.

Ejemplo 8: Tratamiento del Paciente 6 con DAS181 en forma de polvo seco

La paciente 6 era una mujer de 51 años con antecedentes de cáncer de mama y TCMH alogénico de AML s/p relacionado con el tratamiento. A pesar de la remisión de su leucemia, había desarrollado enfermedad de injerto contra hospedante crónica, y síndrome de bronquiolitis obstructiva, que requería tratamiento con micofenolato mofetilo, imatinib, y esteroides crónicos. Desarrolló un aumento agudo de su disnea hasta el punto de que no podía realizar sus actividades básicas de la vida diaria. También desarrolló fiebre nueva y tos persistente e improductiva. Fue ingresada en el hospital para recibir atención adicional. La TC de tórax demostró opacidades difusas en vidrio esmerilado y algunas opacidades nodulares broncovasculares. La PCR de un hisopo nasofaríngeo al ingreso fue positiva para parainfluenza 1 (PIV1) y negativa para gripe y VSR. Se realizó lavado broncoalveolar, y la PCR para PIV1 volvió a ser positiva. Presentó tos seca persistente, disnea de esfuerzo, y requerimiento de oxígeno suplementario de 2 litros.

El régimen de dosificación propuesto fue 10 mg de DAS181, administrados diariamente mediante un inhalador de polvo seco durante un máximo de 5 días, dependiendo de la respuesta y si se observaron efectos adversos. Se planificó obtener muestras de hisopos nasofaríngeos para la determinación cuantitativa de PCR del virus de la parainfluenza y cultivos virales. Se debían recolectar laboratorios de seguridad que incluyeran hemograma completo y análisis químicos completos. Se debían realizar pruebas de función pulmonar basales y diarias durante el tratamiento. Se dejó como posibilidad 5 dosis adicionales de DAS181, dependiendo de la sintomatología y seguridad del paciente.

Se recolectaron muestras antes de cada dosis, incluyendo: hisopos nasofaríngeos (NF), lavado orofaríngeo (OF) y muestras sanguíneas PK de DAS 181. El In-Check DIAL se usó para el entrenamiento de inhalación. También se realizaron pruebas de función pulmonar (PFT). El día 1 de tratamiento los resultados fueron: volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV 1) = 0,78; capacidad vital forzada (FVC)=1,78. Después de un entrenamiento adicional de la técnica de inhalación con el Cyclohaler y una cápsula vacía que se consideró satisfactoria, el sitio clínico procedió a administrar la cápsula de DAS181 a través del Cyclohaler. La paciente necesitó 3 inhalaciones para vaciar el contenido de la cápsula. No tuvo reacciones inmediatas a la administración.

La paciente recibió tratamiento durante 5 días consecutivos, sin experimentar eventos adversos evidentes. Mejoró clínicamente durante el ciclo de tratamiento. Al segundo día de tratamiento, fue dada de alta a casa con menos dificultad para respirar subjetiva. Se autoadministró el tratamiento de DAS 181 los días 3 y 4. Hacia el último día de tratamiento, se sintió mucho mejor, con una tolerancia al ejercicio ligeramente mayor, pero aún no había recuperado su nivel respiratorio inicial. Disminuyeron las secreciones y la tos. Las PFT del último día de tratamiento mostraron un FEV1 de 0,83 l y una FVC de 1,96 l. Fue evaluada 4 días después de su última dosis, y sus síntomas mejoraron aún más. El médico llamó a la paciente días después y notó que se sentía bien, sin efectos adversos relacionados con el medicamento. Su dificultad para respirar mejoró sustancialmente, y pudo reducir su dosis de esteroides para el tratamiento de su enfermedad pulmonar crónica de injerto contra hospedante y el síndrome de bronquiolitis obstructiva.

Se enviaron muestras nasofaríngeas y orofaríngeas para prueba de carga viral de PIV-1, con los siguientes resultados.

Día posterior a la dosis	Copias de PIV1 en hisopo NF/ml	Copias de PIV1 en lavado OF/ml
Día 1 (antes de la dosis 1)	$9,60 \times 10^5$	$3,95 \times 10^4$
Día 2 (antes de la dosis 2)	$5,95 \times 10^5$	$4,82 \times 10^5$
Día 5 (antes de la dosis 5)	$3,42 \times 10^7$	$5,30 \times 10^6$
Día 9 (4 días después de la dosis 5)	$1,03 \times 10^4$	$5,70 \times 10^3$

Tanto la carga viral de PIV nasofaríngeo como orofaríngeo mostraron una caída sustancial después del tratamiento con DAS181, lo que fue paralelo a su marcada mejoría clínica.

Ejemplo 9: Tratamiento del Paciente 7 con DAS181 en forma de polvo seco

La paciente 7 era una mujer de 64 años con antecedentes de fibrosis pulmonar idiopática (FPI) que se sometió a un trasplante de pulmón derecho. Su curso inicial postrasplante se complicó por un rechazo humorral agudo manejado con plasmáferesis e IGIV, y no podía tolerar MMF o Imuran, por lo que se mantuvo con prednisona y tacrolimus. Varias semanas antes de su ingreso, su marido enfermó con una infección de las vías respiratorias superiores de la que se recuperó sin incidentes. La paciente comenzó entonces a experimentar dificultad para respirar y tos cada vez mayores, tuvo una saturación de O₂ en casa que era del 80%, y posteriormente fue admitida en la institución clínica. Una broncoscopia (BAL) no mostró evidencia de infección bacteriana o fúngica, o PJP, pero dio positivo para PIV3 mediante PCR. Más tarde, desarrolló una hipoxia que empeoró, y fue trasladada a la unidad de cuidados intensivos para recibir

soporte y monitorización con oxígeno de alto flujo. Continuó necesitando soporte de oxígeno de alto flujo y permaneció en una FiO₂ del 65% sin signos de mejoría. Su inmunosupresión se estaba minimizando en la medida de lo posible.

5 Se inició la dosificación con DAS181. La paciente recibió 5 dosis de DAS 181 (10 mg/día mediante inhalador de polvo seco). La paciente recibió el fármaco y respondió bastante bien, con una rápida mejoría tanto en los parámetros virológicos como clínicos. No tuvo efectos adversos significativos asociados con el medicamento. Se observó una marcada mejora en la carga viral de PIV3, como se muestra en la Figura 20.

En la Figura 21 se muestra una descripción general de la dosificación, los medicamentos relevantes concomitantes, la carga viral y los requisitos de oxígeno de apoyo. Como se puede observar, la carga viral y el soporte de oxígeno requerido se redujeron notablemente después de la dosificación con DAS181.

10 Ejemplo 10: Tratamiento del Paciente 8 con DAS181 en forma de polvo seco

El paciente 8 era un hombre de 57 años con antecedentes de enfermedad de Hodgkin que recibió un TCMH alogénico por enfermedad recurrente. Posteriormente recayó y recibió una infusión de linfocitos de un donante. Su curso clínico se complicó por la enfermedad de injerto contra hospedante (EICH).

15 Ingresó con quejas de dificultad para respirar, tos, hemoptisis, y síndrome nefrótico de nueva aparición. La broncoscopia con lavado broncoalveolar fue significativa para la hemorragia alveolar difusa. La tomografía computarizada del tórax fue notable por opacidades difusas en vidrio esmerilado, y al paciente se le confirmó parainfluenza tipo 3 mediante PCR en líquido BAL. Su estado clínico empeoraba y requería 5 litros/minuto de oxígeno (O₂) y tenía una saturación del 93%. Su saturación de oxígeno cayó en los 80 con una actividad mínima.

20 El uso de DAS181 en el caso de este paciente fue aprobado por la FDA. El régimen de dosificación aprobado fue la administración de DAS 181 en forma de polvo seco durante 5 días consecutivos. Se recogieron muestras de hisopos nasofaríngeos antes de cada dosis para evaluar la carga viral. Tras el entrenamiento de la técnica de inhalación con el Cyclohaler, que fue satisfactorio, se le administró DAS 181. El paciente no tuvo reacciones inmediatas a la administración. Recibió tratamiento durante 5 días consecutivos, sin presentar eventos adversos evidentes. El paciente tomó su última dosis de DAS 181 y fue dado de alta del hospital tras mejorar clínicamente.

25 Se evaluaron muestras nasofaríngeas para detectar copias de ARN de PIV3/ml, y mostraron una caída sustancial en la carga viral, lo que eventualmente condujo a títulos indetectables.

Día de dosificación (Día 1=Dosis 1)	Copias de PIV3 en hisopo nasofaríngeo/ml
Día 1 (muestra tomada antes de la dosis 1)	26.400
Día 2 (muestra tomada antes de la dosis 2)	4.900
Día 3 (muestra tomada antes de la dosis 3)	11.600
Día 4 (muestra tomada antes de la dosis 4)	3.290
Día 5 (muestra tomada antes de la dosis 5)	Indetectable

30 Como se puede ver en la tabla anterior, la carga viral cayó a indetectable después del tratamiento con DAS 181 en forma de polvo seco durante 5 días. Esta caída en la carga viral también se correlacionó con la mejoría clínica y el posterior alta hospitalaria experimentada por este paciente. El paciente también requirió un soporte sustancial de oxígeno suplementario antes del tratamiento con DAS 181, que se alivió después del tratamiento.

Ejemplo 11 - Preparación de DAS181

Preparación de DAS181 para uso en formulaciones en aerosol

35 Una disolución madre de DAS181 (1,0 -10,0 mg/ml) en agua se puede almacenar a 2 - 8°C durante al menos una semana. Las disoluciones de dosis a menor concentración se preparan recientes diariamente y se almacenan en condiciones ambientales o se refrigeran hasta su uso. Para disoluciones dosificadas, la disolución madre se puede diluir en disolución salina normal u otra disolución acuosa farmacéuticamente adecuada.

40 DAS181 es una proteína de fusión que contiene el dominio de unión a heparina (glisosaminoglicano, o GAG) de la anfíregulina humana fusionado a través de su extremo N al extremo C de un dominio catalítico de *Actinomyces viscosus* (la secuencia de aminoácidos en DAS 181 que tiene una Met amino terminal se expone en SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos en DAS181 que carece de una Met amino terminal se expone en SEQ ID NO: 1).

La proteína DAS 181 se puede preparar y purificar como se describe en Malakhov et al. 2007 Antimicrobial Agents Chemotherapy 1470-1479. Brevemente, un fragmento de ADN que codifica DAS181 con una Met amino terminal se clonó en el vector plasmídico pTrc99a (Pharmacia) bajo el control de un promotor inducible por IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranósido). El constructo resultante se expresó en la cepa BL21 de *Escherichia Coli* (*E.Coli*). Las células de

ES 2 970 401 T3

E. coli que expresan la proteína DAS181 se lavaron mediante diafiltración en una etapa de lavado de cosecha de fermentación, usando amortiguador Toyopearl 1, cartucho de fibra hueca UFP-500-E55 (GE Healthcare) y una bomba peristáltica Watson-Marlow. La proteína DAS 181 recombinante se puede purificar en masa a partir de las células como se describe en los documentos publicados US 2005/0004020 y US 2008/0075708.

5 SEQ ID NO:1

MGDHPQATPA PAPDASTELP ASMSQAQHLA ANTATDNYRI PAITTAPNGD
LLISYDERPK DNGNGGSDAP NPNHIVQRRS TDGGKTWSAP TYIHQGTETG
KKGVYSDPSY VVDHQTGTIF NFHVKSVDQG WGGSRGGTDP ENRGIIQAEV
STSTDNGWTW THRTITADIT KDKPWTARFA ASGQGIQIQC GPHAGRLVQQ
YTIRTAGGAV QAVSVYSDDH GKTWQAGTPPI GTGMDENKVV ELSDGSMLN
SRASDGSGFR KVAHSTDGGQ TWSEPVSDKN LPDSVDNAQI IRAFPNAAPD
DPRAKVLLS HSPNPRPWSR DRGTISMSCD DGASWTTSKV FHEPFVGYTT
IAVQSDGSIG LLSEDAHNGA DYGGIWYRNFT TMNWLGEQCG QKPAKRKKKG
GKNGKNRRNR KKKNP

SEQ ID NO:2

GDHPQATPAP APDASTELPA SMSQAQHLAA NTATDNYRIP AITTAPNGDL
LISYDERPKD NGNGGSDAPN PNHIVQRST DGGKTWSAPT YIHQGTETGK
KVGYSDPSYV VDHQTGTIFN FHVKSVDQGW GGSRGGTDP E NRGIIQAEVS
TSTDNGWTWT HRTITADITK DKPWTARFAA SGQGIQIQC HG PHAGRLVQQY
TIRTAGGAVQ AVSVYSDDHG KT WQAGTPIG TGMDENKVE LSDGSMLNS
RASDGSGFRK VAHSTDGGQT WSEPVSDKNI PDSVDNAQII RAFPNAAPDD
PRAKVLLSH SPNPRPWSRD RGTISMSCDD GASWTTSKVF HEPFVGYTTI
AVQSDGSIGL LSEDAHNGAD YGGIWYRNFT MNWLGEQCGQ KPAKRKKKG
KNGKNRRNRK KKNP

REIVINDICACIONES

- 5 1.Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para uso en un método para tratar la infección por el virus de la parainfluenza o de la gripe, comprendiendo el método administrar dicha composición al aparato respiratorio de un paciente, en el que la composición está en forma líquida y la administración es mediante nebulizador, en el que se administra al paciente 0,1 - 10 mg de la proteína por día.
- 10 2.La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el paciente es un paciente inmunodeprimido.
- 10 3.La composición para uso según la reivindicación 2, en la que el paciente inmunodeprimido padece una inmunodeficiencia primaria.
- 15 4.La composición para uso según la reivindicación 2, en la que el paciente inmunodeprimido padece una inmunodeficiencia secundaria.
- 15 5.La composición para uso según la reivindicación 2, en la que el paciente inmunodeprimido está siendo o ha sido tratado con una terapia inmunsupresora.
- 15 6.La composición para uso según la reivindicación 2, en la que el paciente inmunodeprimido está siendo o ha sido tratado con un agente quimioterapéutico.

Paciente con IND de emergencia para PIV3: Inoculación inicial en células LLCMK-2

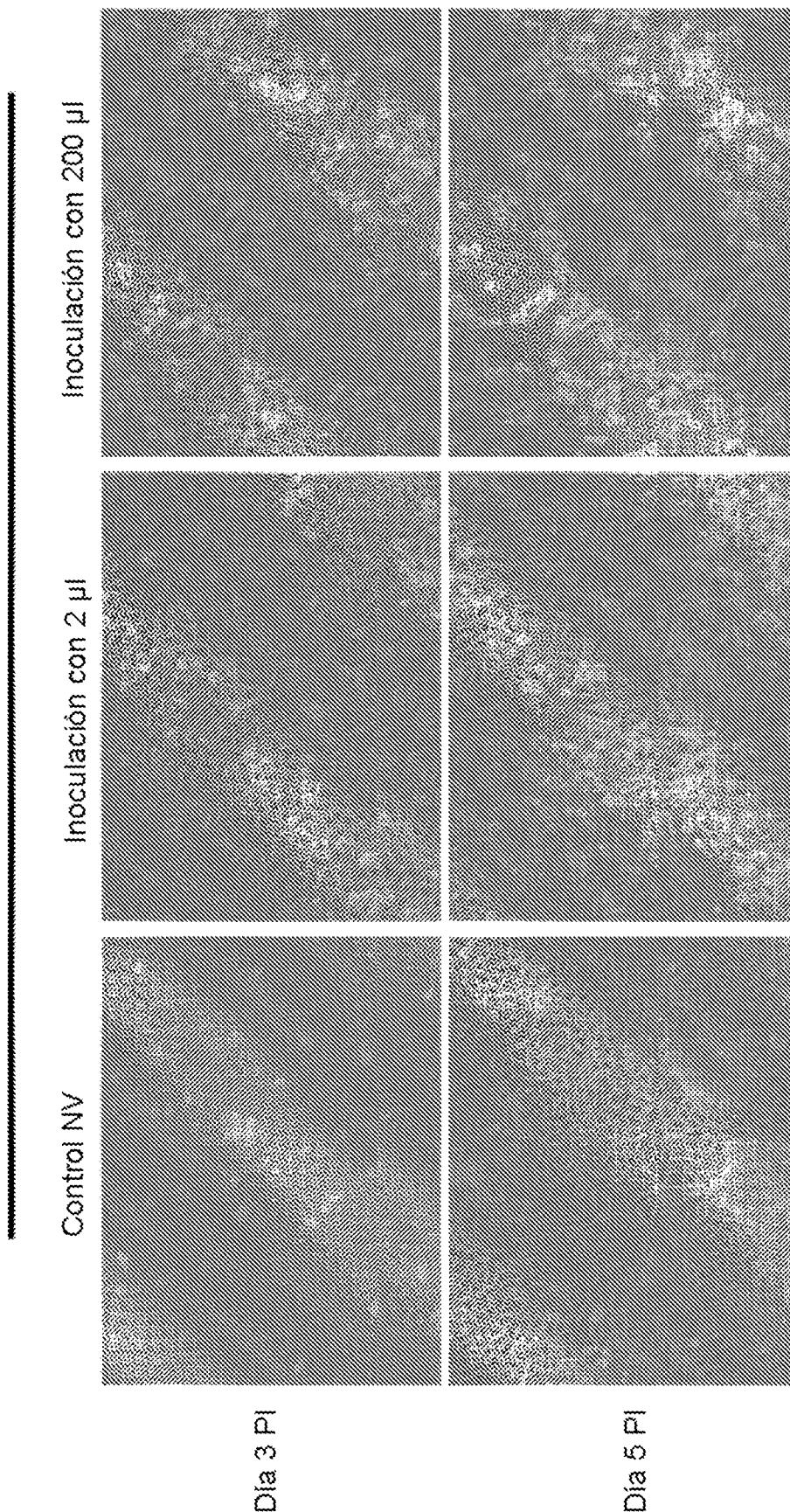


FIG. 1

Ensayo de anticuerpo inmunofluorescente directo para detectar la presencia de PIV3

Día 3 después de la infección

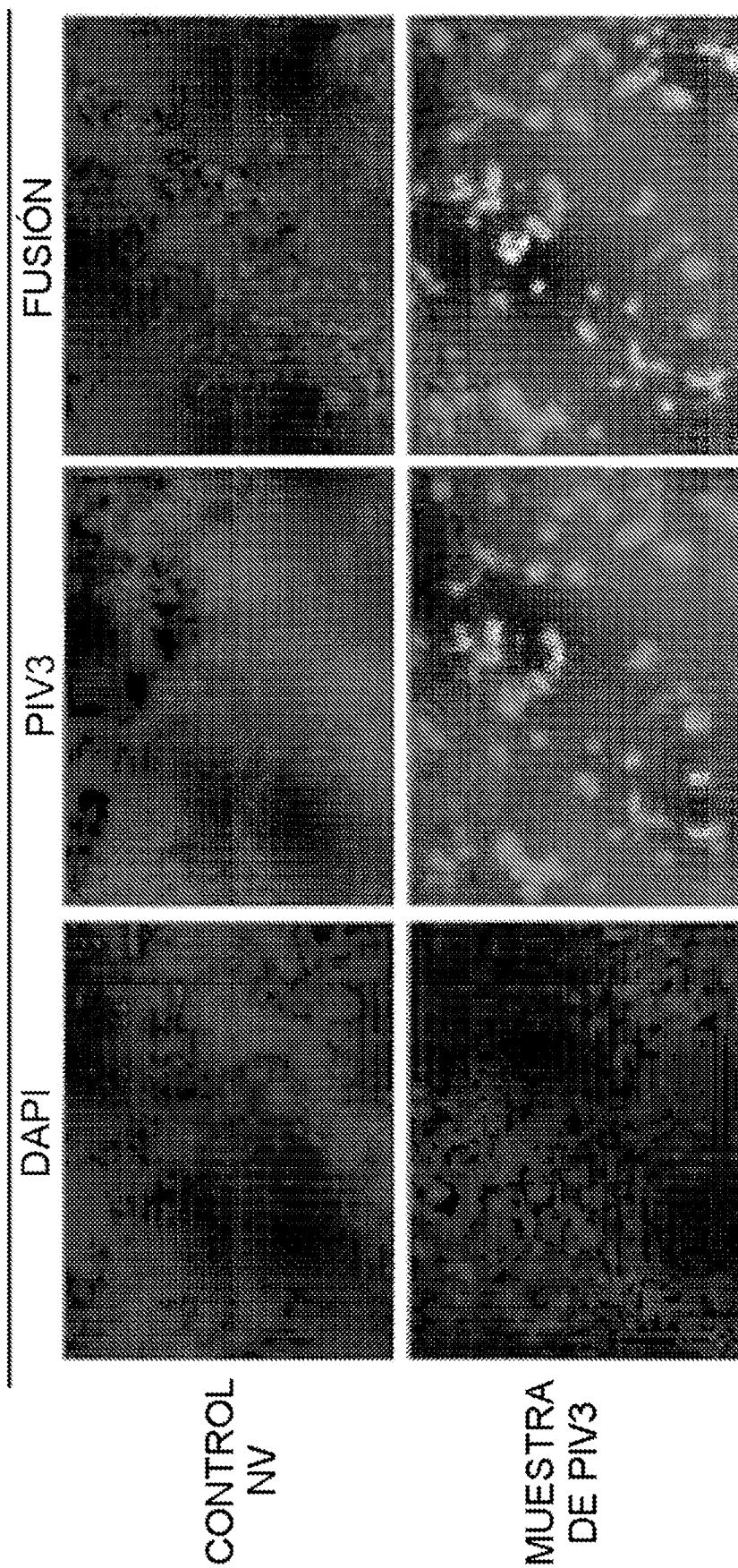


FIG. 2

Ensayo de placas de PIV3 (DFA, placa de 24 pocillos, Día 2 PI)

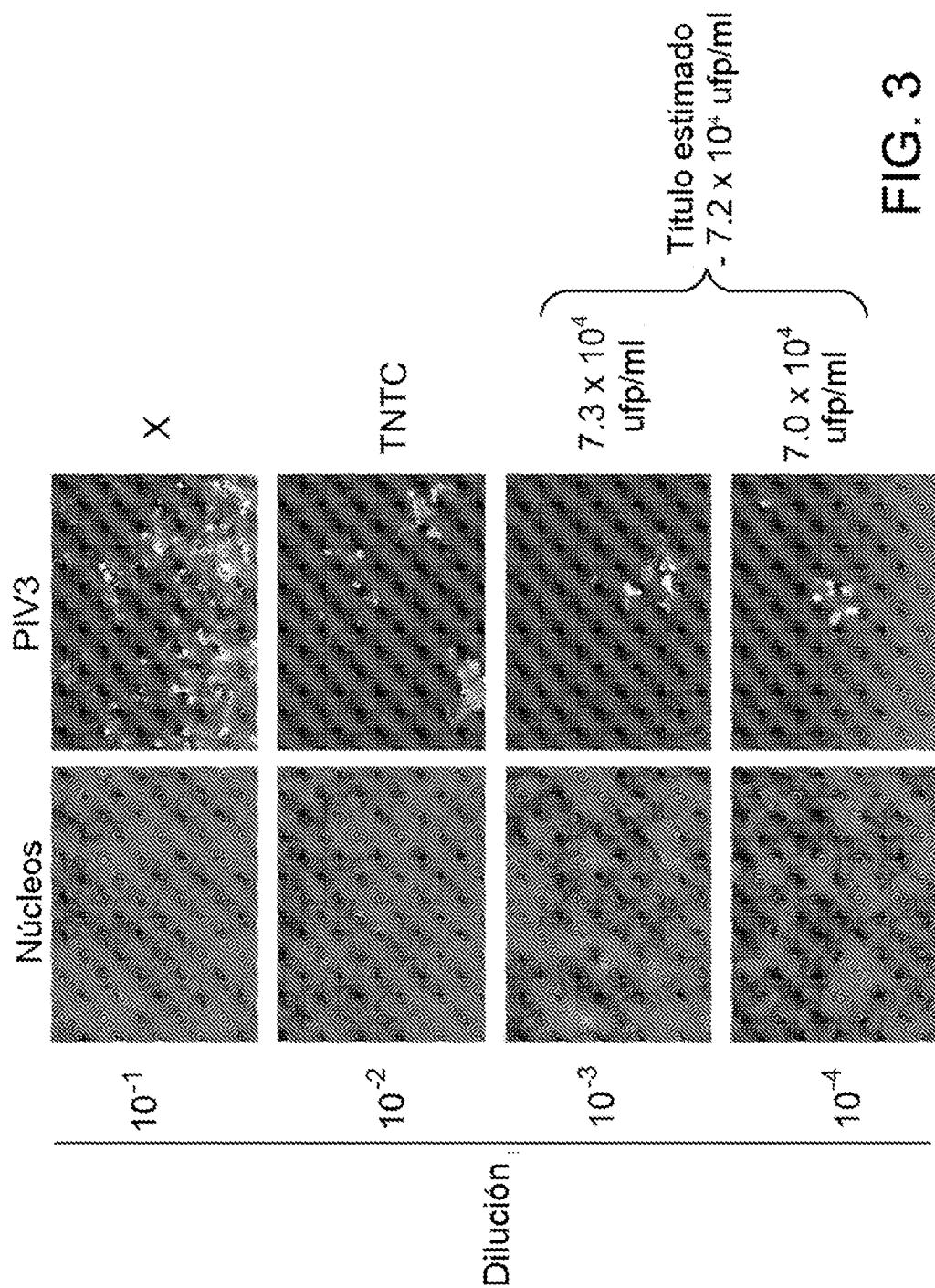
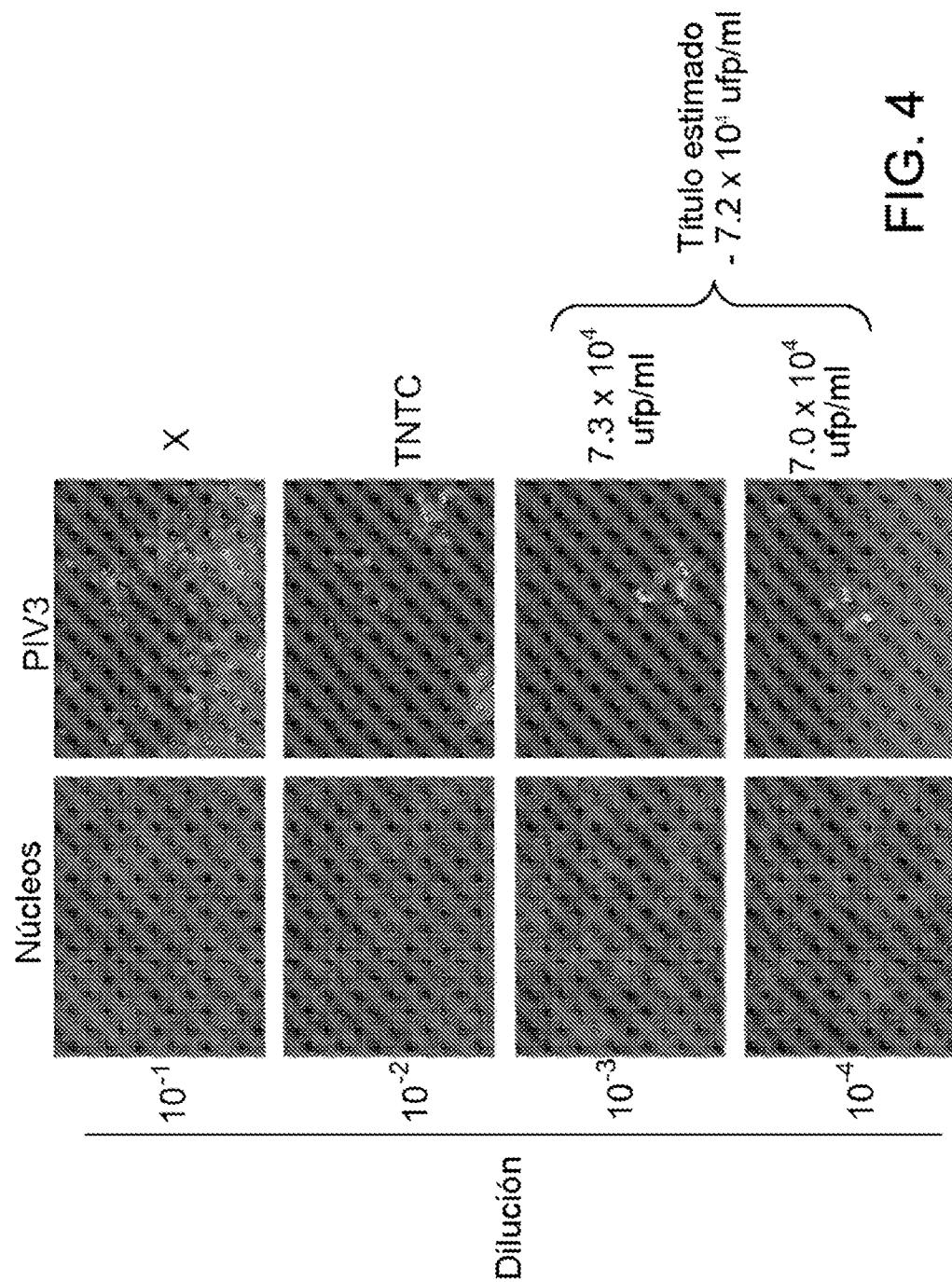
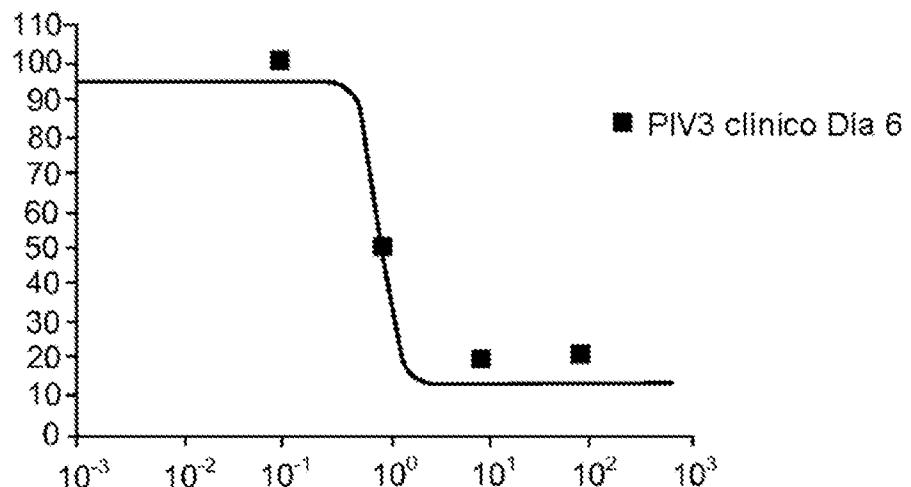


FIG. 3

Ensayo de placas de PIV3 (DFA, placa de 24 pocillos, Día 2 PI)



Ensayo de reducción de placas con EIND clínico para PIV3 Día 6



Ensayo de reducción de placas con EIND clínico para PIV3 Día 7

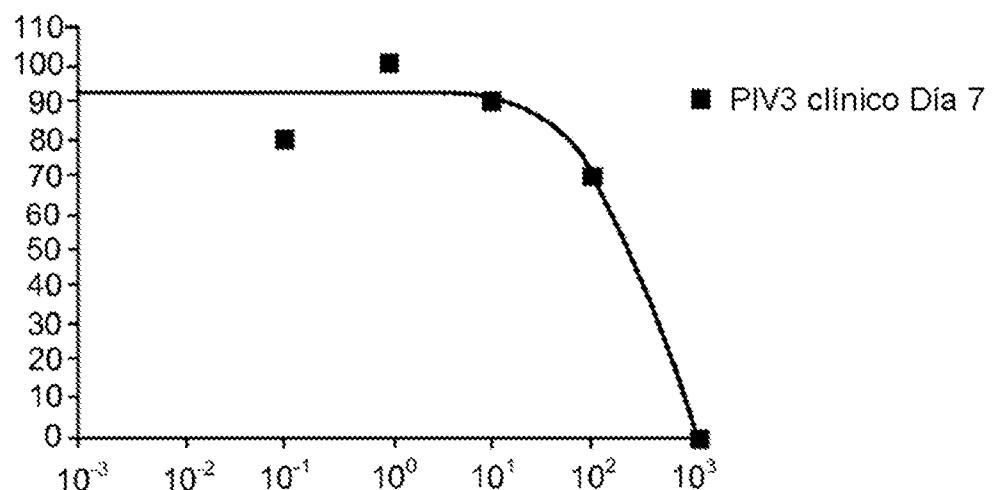


FIG. 5

EIND clínico para PIV3 (DFA, placa de 24 pocillos, Día 2 PI)

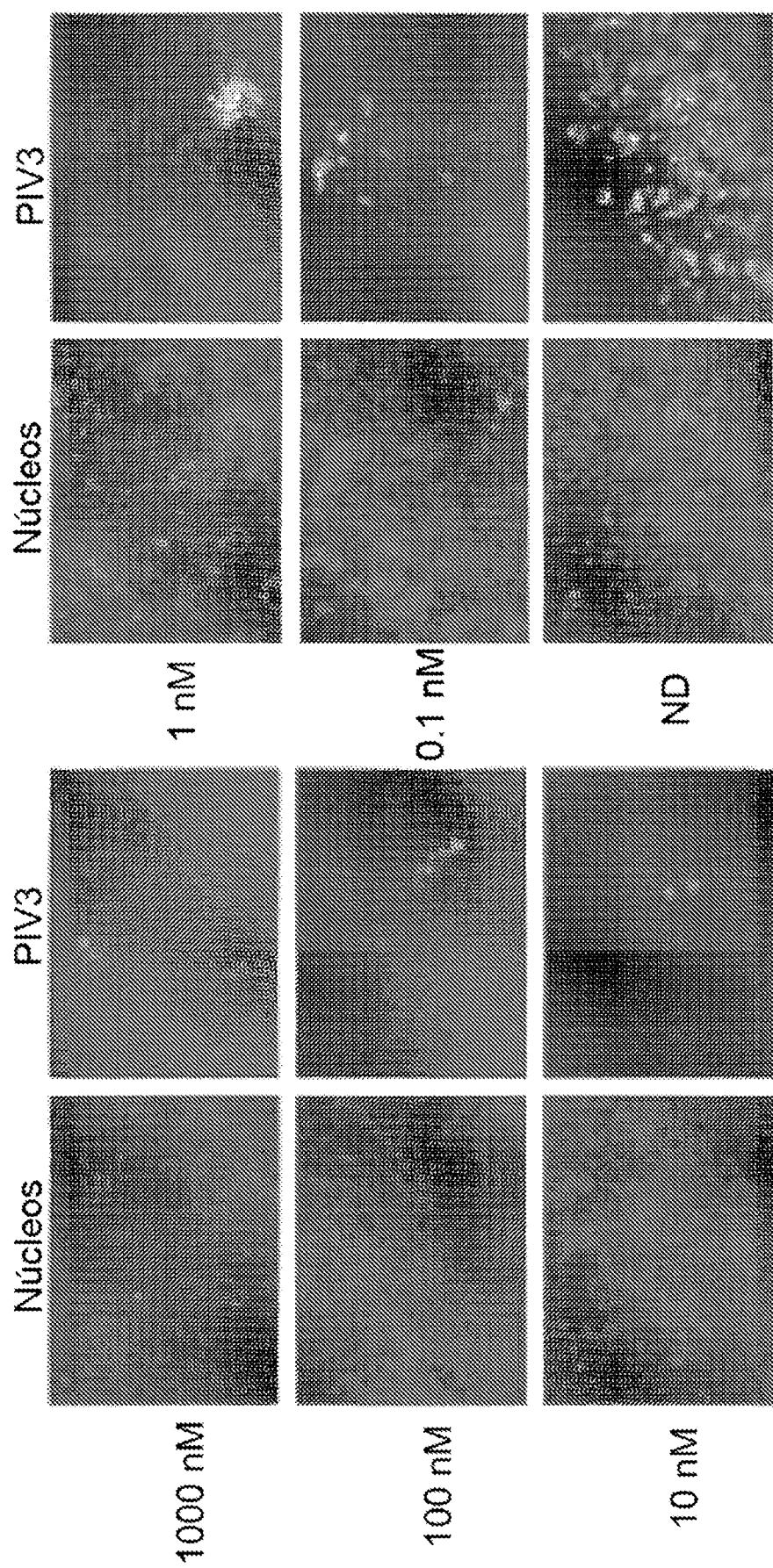


FIG. 6

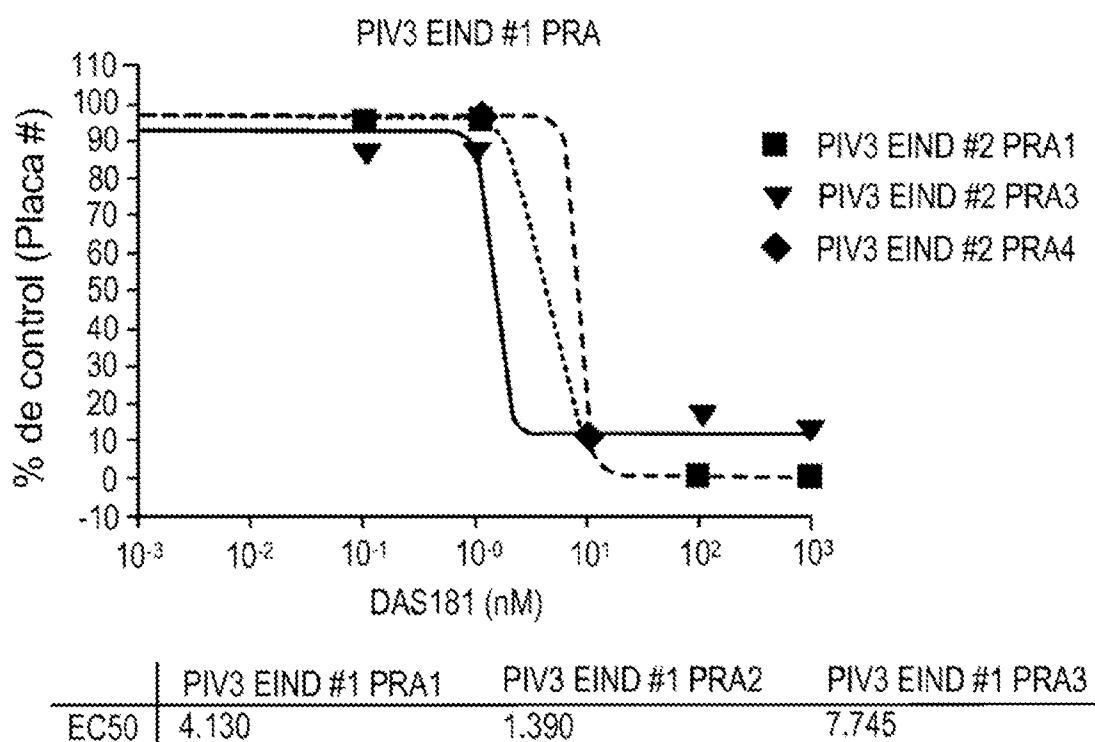


FIG. 7

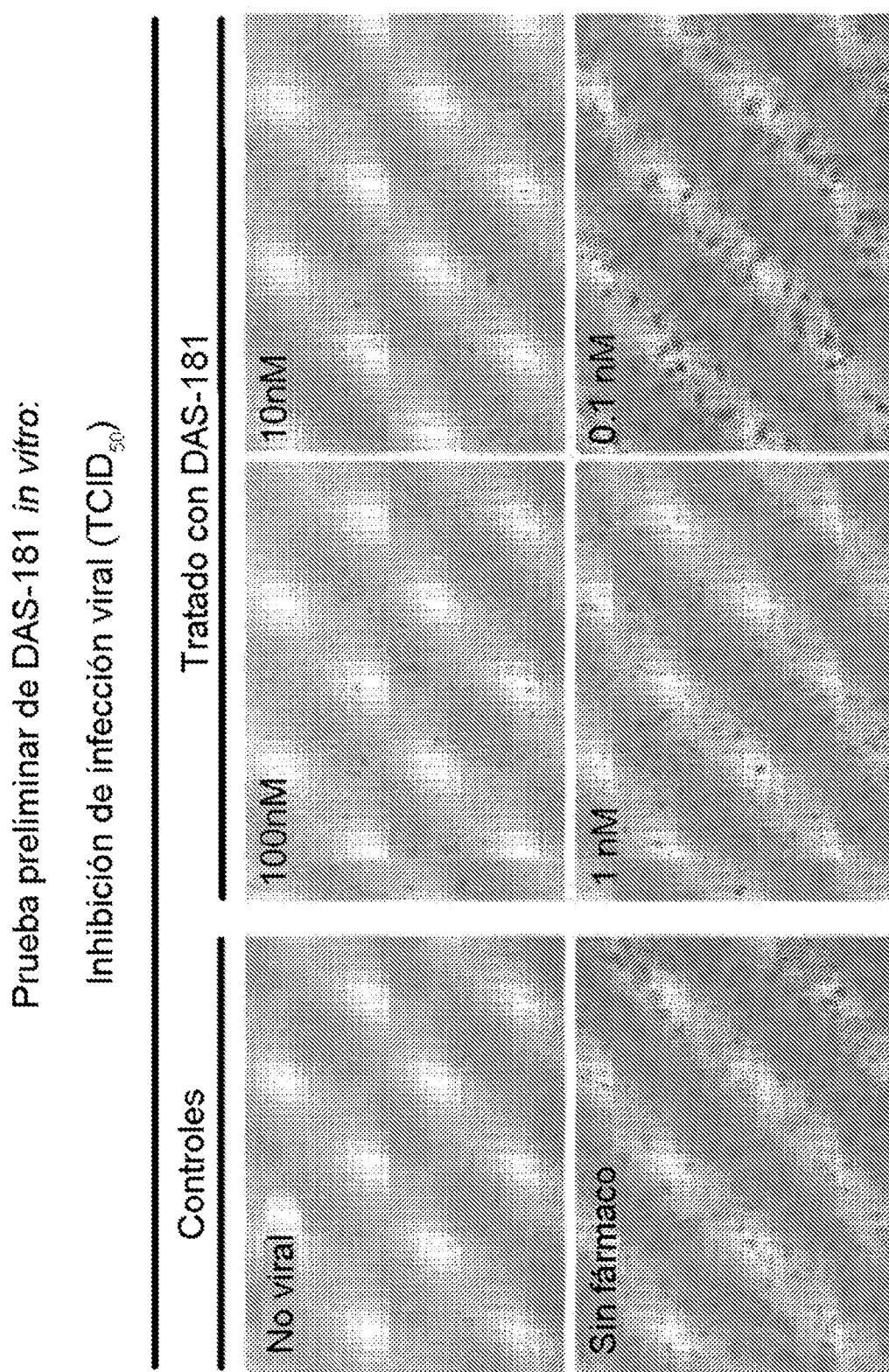
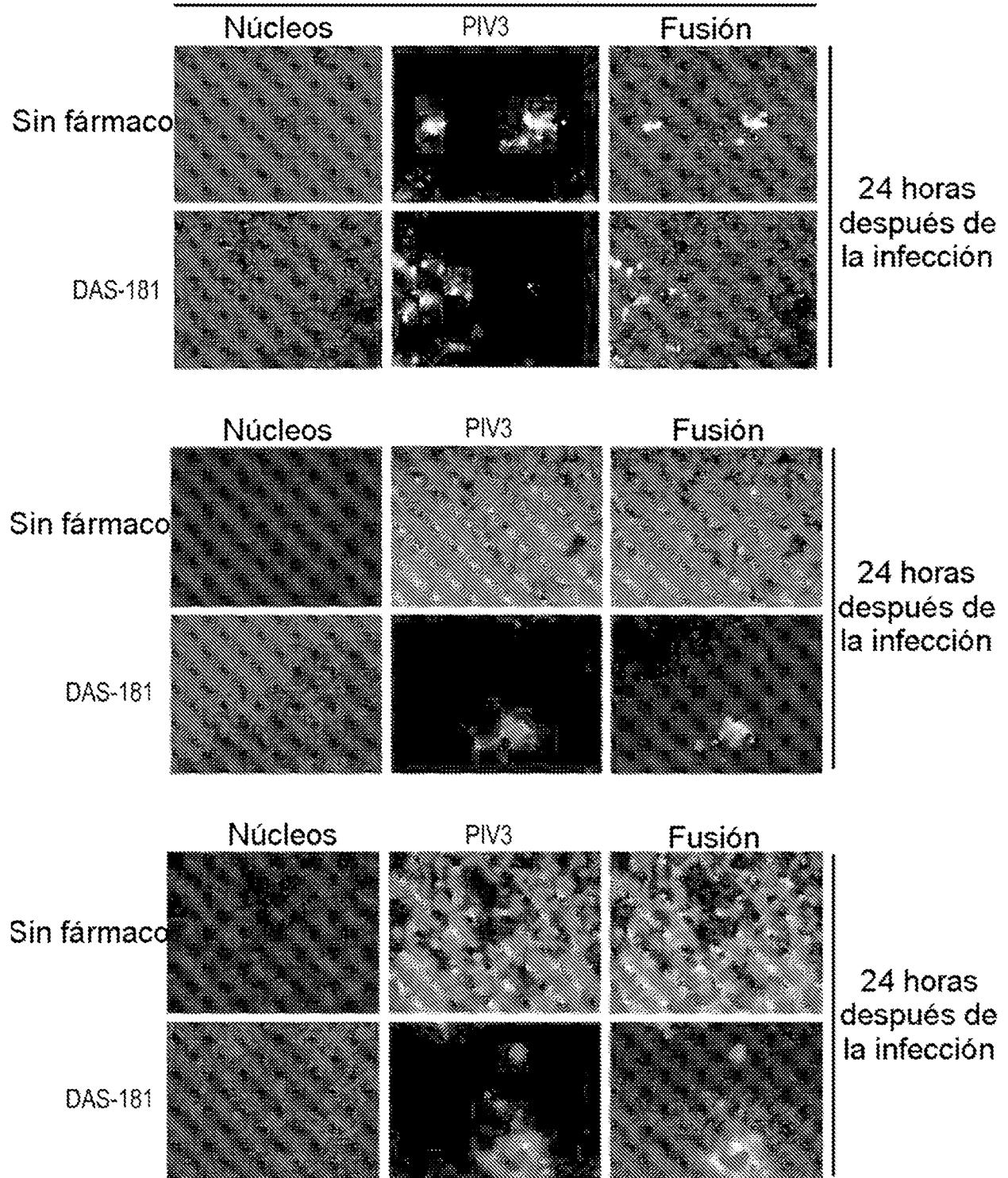
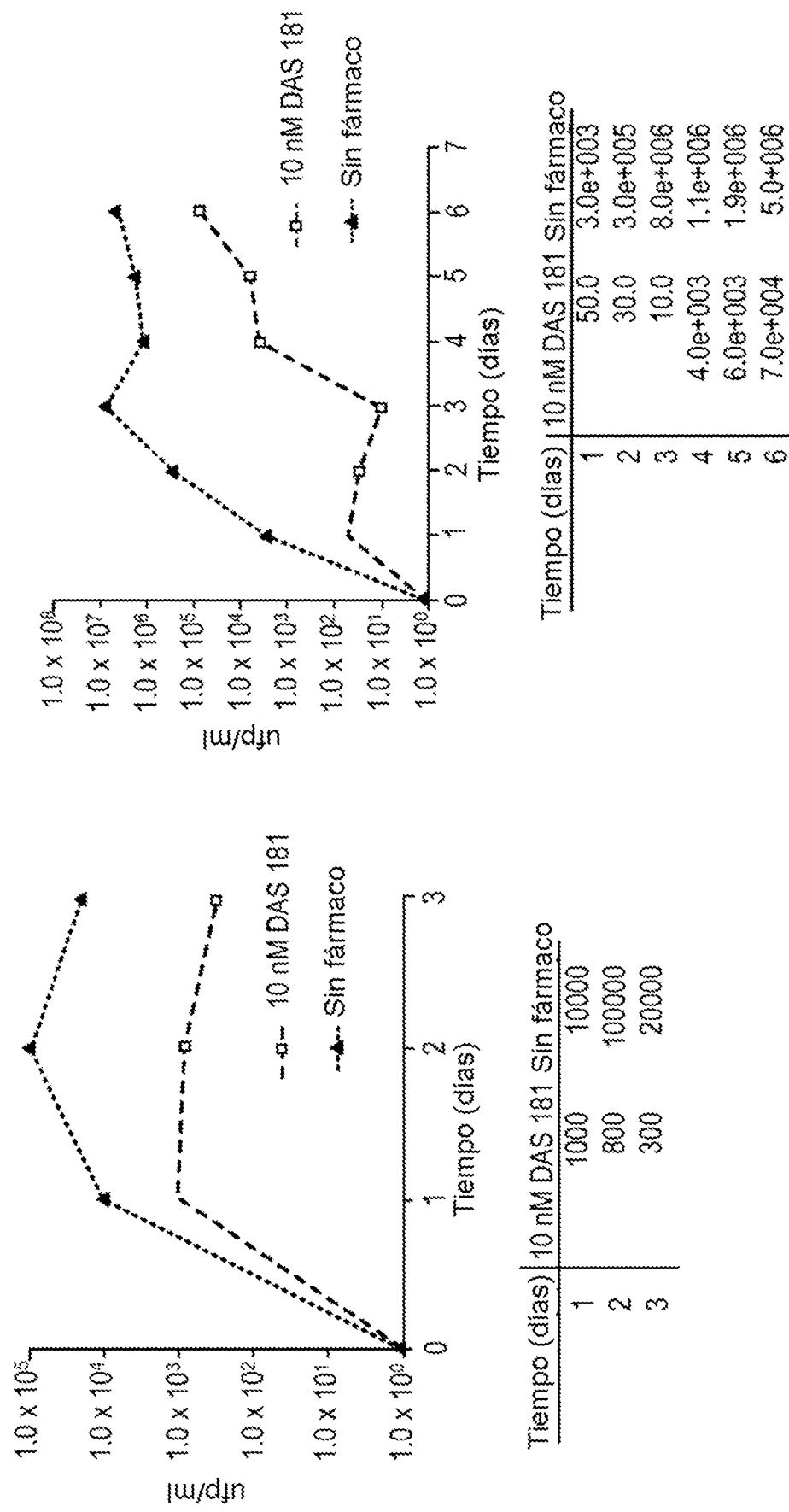


FIG. 8

Prueba de PIV3 (virus de paciente con EIND) con DAS-181**FIG. 9**

Análisis de liberación viral PIV3 EIND #1 +/- DAS181

Curva de crecimiento de 6 días de PIV3-EIND#1
(Ensayo de placas)**FIG. 10****FIG. 11**

Inoculación de muestra de EIND de PIV3 en células L-LCMK2

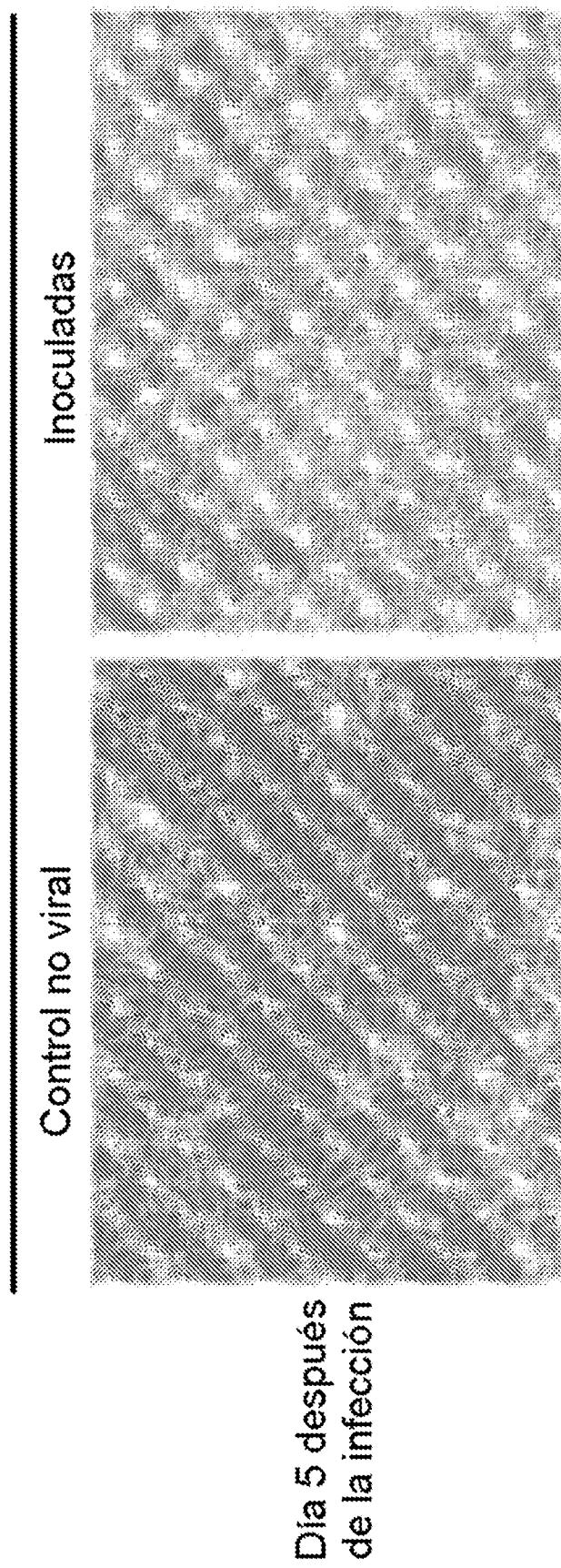


FIG. 12

Prueba de DFN en la pasada 1 (inoculación inicial de PIV3-EIND#2)

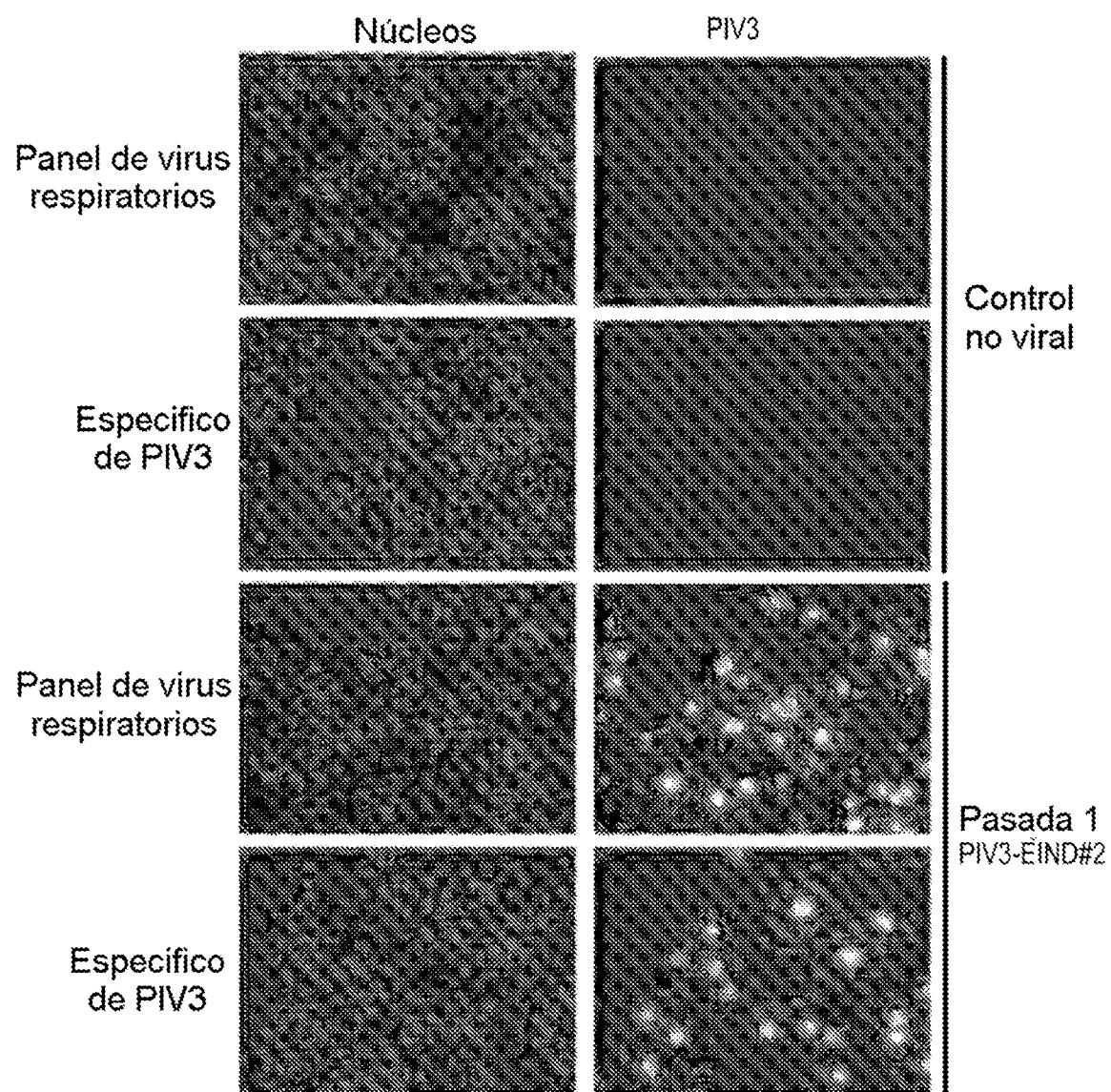


FIG. 13

Formación de placas 48 hpi de PIV3 EIND#2

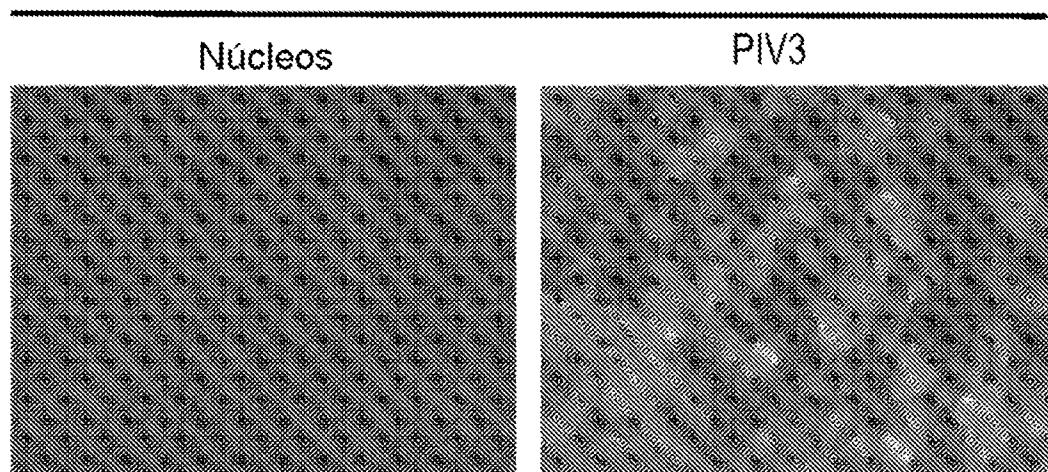


FIG. 14

PIV3 clínico EIND#2 PARA

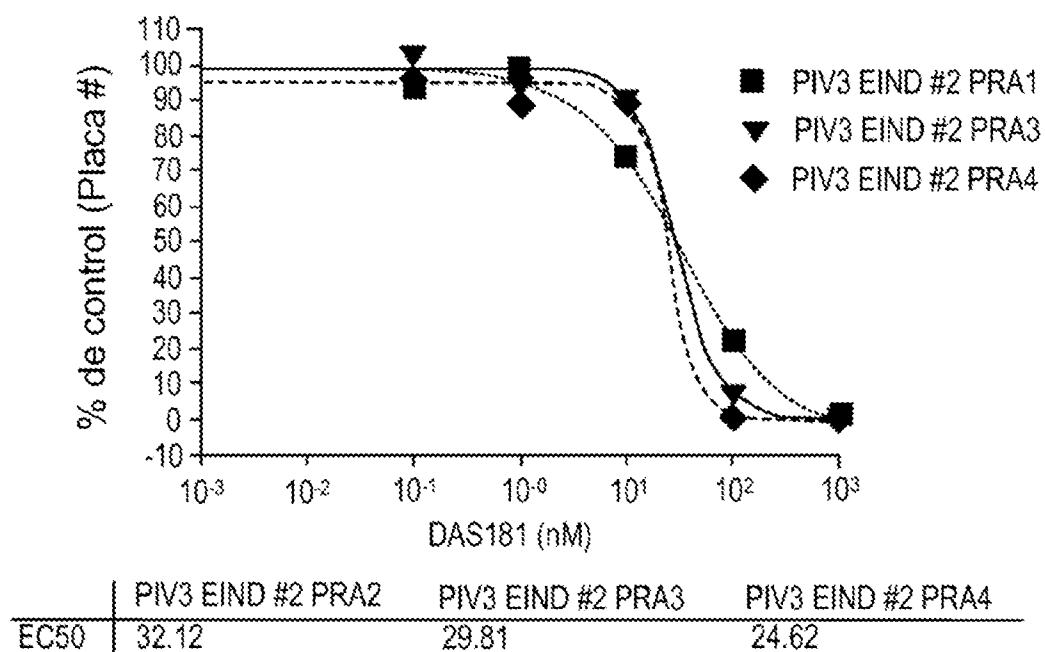


FIG. 15

Inhibición de TCID50 mediante DAS181

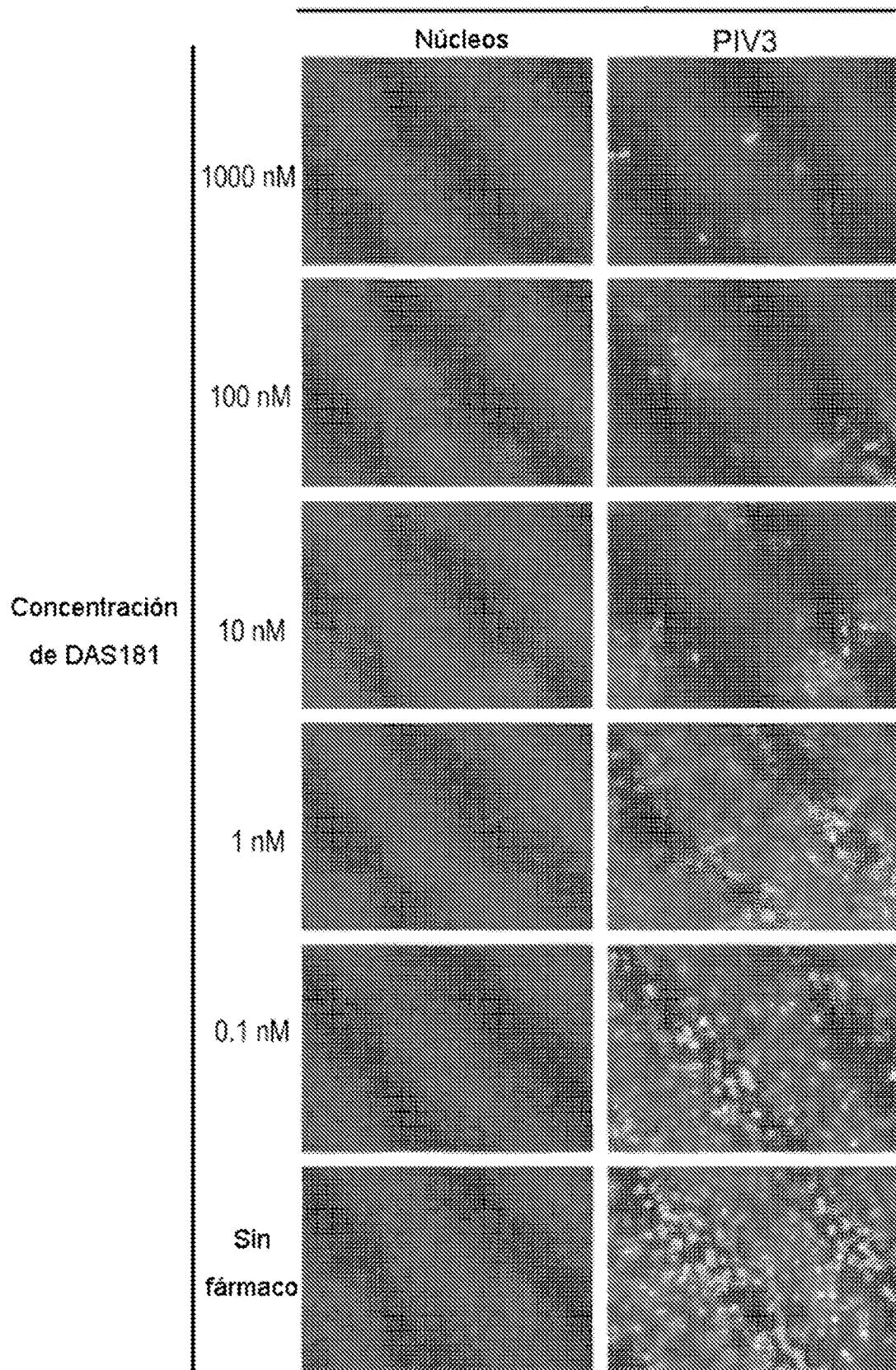


FIG. 16

Análisis de crecimiento 3 días de PIV3 EIND #2

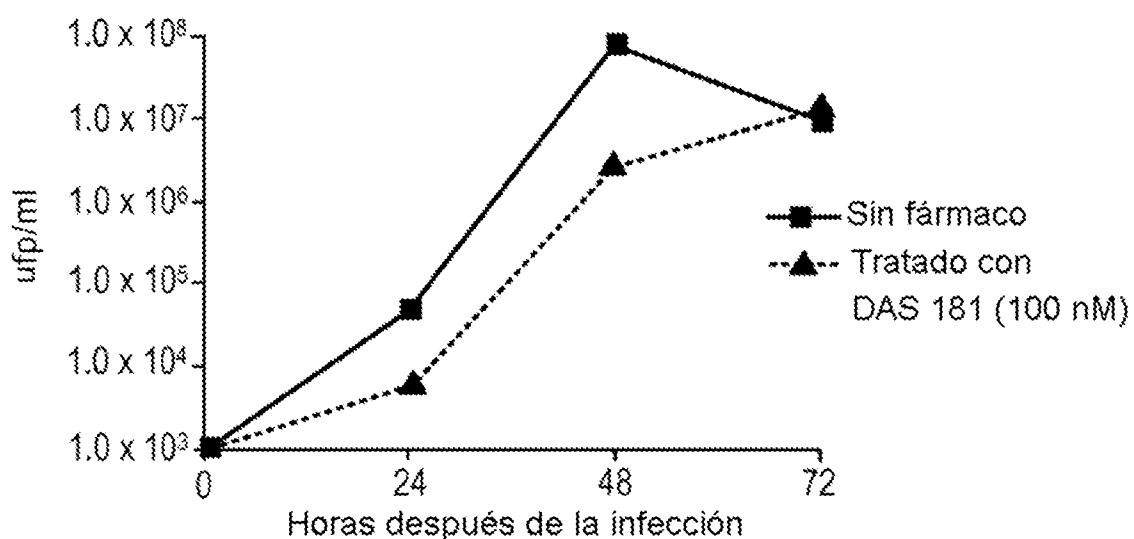


FIG. 17

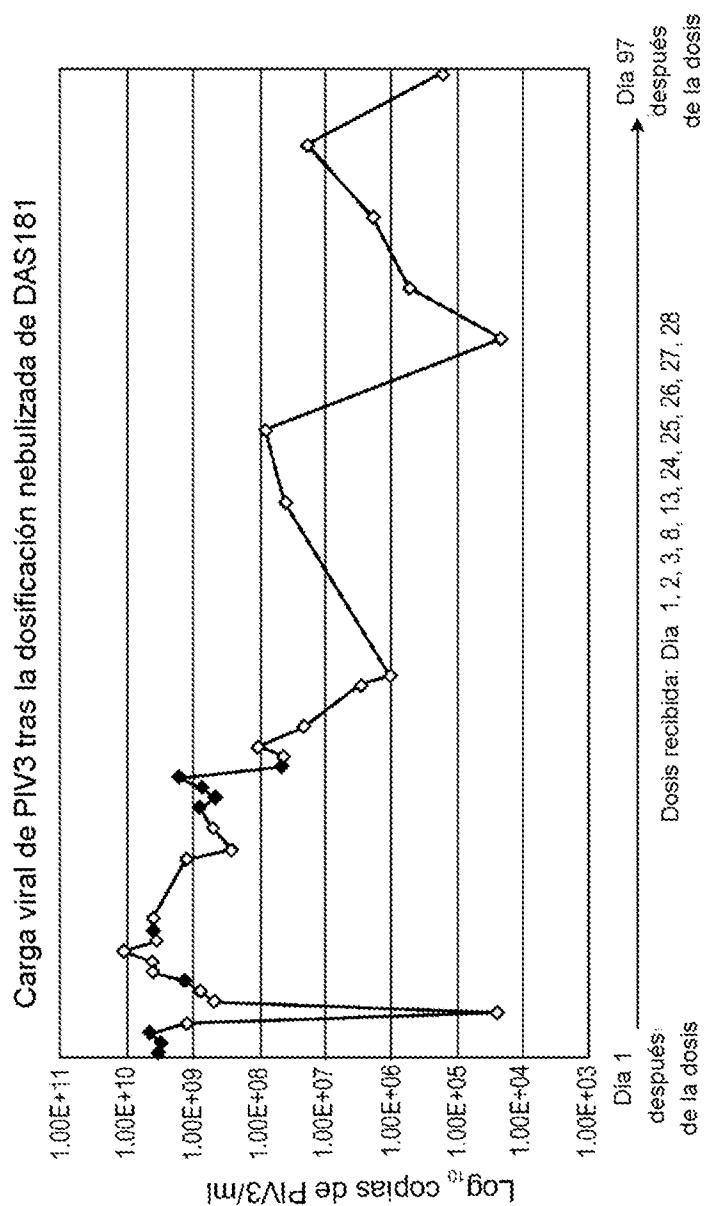


FIG. 18

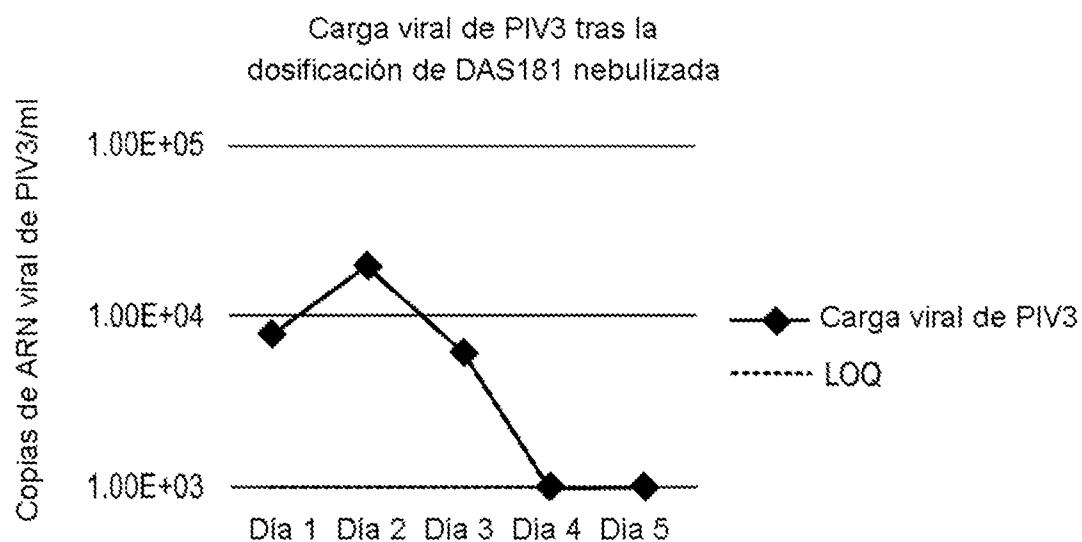


FIG. 19

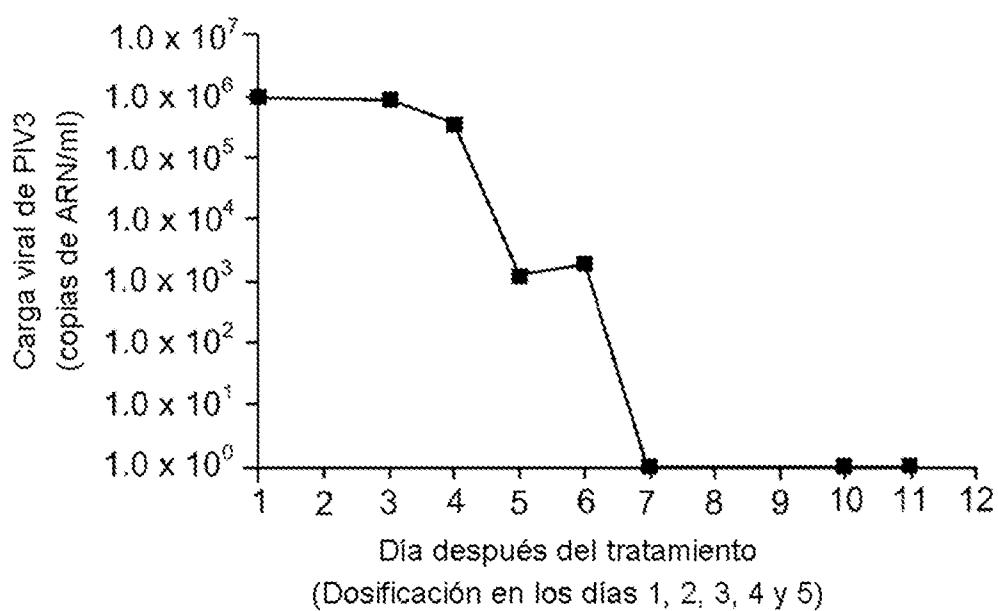


FIG. 20

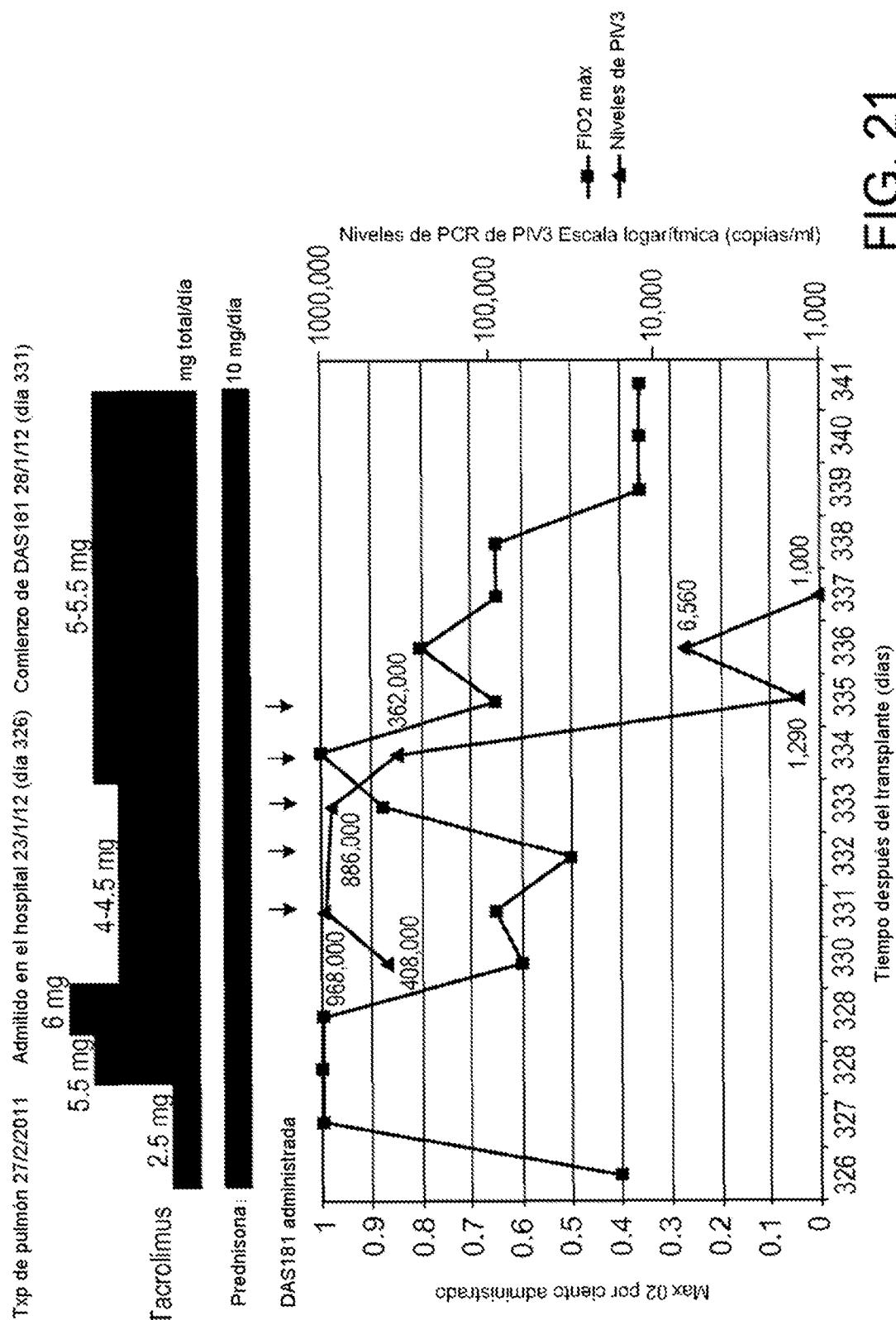


FIG. 21