

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.04.12	(73) Titular(es): SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A. VIALE SHAKESPEARE 47 00144 ROMA	IT
(30) Prioridade(s): 2006.05.02 EP 06113401		
(43) Data de publicação do pedido: 2009.01.14	(72) Inventor(es): LUIGINA ROMANI FRANCESCO BISTONI ENRICO GARACI	IT IT IT
(45) Data e BPI da concessão: 2012.06.27 158/2012	(74) Mandatário: MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA DOS BACALHOEIROS, Nº 4 1100-070 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **USO DE TIMOSINA 1, ISOLADA OU EM COMBINAÇÃO COM PTX3 OU GANCICLOVIR, PARA O TRATAMENTO DA INFEÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS**

(57) Resumo:

É DESCRITO O USO DE TIMOSINA ALFA 1 EM COMBINAÇÃO COM PENTRAXINA PTX3 OU GANCICLOVIR, PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PARA A PREVENÇÃO OU TRATAMENTO DE DOENÇAS VIRAIS E/OU INIBIÇÃO DA ATIVAÇÃO DO VÍRUS.

RESUMO

USO DE TIMOSINA 1, ISOLADA OU EM COMBINAÇÃO COM PTX3 OU GANCICLOVIR, PARA O TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS

É descrito o uso de Timosina alfa 1 em combinação com pentraxina PTX3 ou Ganciclovir, para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de doenças virais e/ou inibição da ativação do vírus.

DESCRIÇÃO

USO DE TIMOSINA 1, ISOLADA OU EM COMBINAÇÃO COM PTX3 OU GANCICLOVIR, PARA O TRATAMENTO DA INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS

A invenção aqui descrita refere-se ao uso de Timosina alfa 1 (T α 1), isolada ou em combinação com a pentraxina PTX3 longa (PTX3) para a preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de infecções virais e/ou para a inibição de ativação do vírus, na qual o referido vírus é herpesvírus, tal como citomegalovírus (CMV).

Citomegalovírus humano (HCMV) é um herpesvírus comumente encontrado em cerca de 50% da população em geral. Cerca de 90% das pessoas com VIH são portadores de HCMV. Na população em geral, o vírus normalmente permanece latente nos tecidos do corpo após a infecção inicial. Ele pode, no entanto, ser transmitido pela boca, urina e trato genital, servindo como uma fonte de infecção para outras pessoas. A infecção com HCMV pode resultar em infecções secundárias mais graves se o sistema imunitário tornar-se comprometido por qualquer motivo.

Cerca de 5% de crianças que adquirem HCMV através de transmissão vertical têm graves defeitos congênitos. Estes incluem danos cerebrais, insuficiência de crescimento, cegueira e outros defeitos. Esse problema geralmente ocorre quando a mãe é infetada com HCMV, pela primeira vez durante a gravidez.

Na população adulta em geral, HCMV está inativo, mas pode estar associado ao desenvolvimento de doença arterial coronária. A infecção com HCMV foi associada ao desenvolvimento de placas arteriais e aterosclerose.

HCMV pode causar problemas graves em pessoas com sistemas imunitários debilitados.

Este é um problema mais comum em pessoas com SIDA ou naqueles pacientes sob terapia imunossupressora. O HCMV infecta entre 75 a 100% de pacientes VIH positivo. As complicações mais comuns associadas com HCMV incluem coriorretinite; infecções do trato gastrointestinal, inclusive hepatite, esofagite, colite, gastrite, e pancreatite, envolvimento neurológico, incluindo encefalite e poliradiculopatia; envolvimento pulmonar; e epididimite.

Pessoas com cancro generalizado ou pessoas que receberam transplantes de medula óssea ou de órgãos são comumente afetados. A infecção pode ser devido a um primeiro tempo de exposição ao HCMV ou como resultado de HCMV reativado. No paciente de transplante e paciente com cancro, o HCMV geralmente provoca pneumonia ou uma infecção gastrointestinal, resultando em diarreia, que pode causar a morte. Além disso, HCMV contribui para o desenvolvimento da disfunção crônica em recetores de aloenxerto de transplantes de órgãos sólidos. A relação entre a doença HCMV e o desenvolvimento de bronquiólite obliterante em recetores de transplante de pulmão está bem estabelecida. Além disso, HCMV é um dos inúmeros fatores de risco que podem levar a lesão do aloenxerto. Invasão viral direta de aloenxerto pode causar hepatite através de HCMV no fígado e no rim em pacientes transplantados. Além disso em relação às síndromes diretas produzidas por HCMV, a infecção com este vírus pode aumentar o risco de fungos e outras infecções oportunistas, tais como pneumonia *Pneumocystis carinii* e vírus de Epstein-Barr relacionada com o vírus doença linfoproliferativa pós transplante.

A maioria das pessoas foi infetada com HCMV em idade adulta. Qualquer pessoa que receba uma transfusão de sangue ou um transplante de órgão está em risco de infeção por HCMV.

Além disso, as pessoas com sistemas imunitários debilitados e crianças não nascidas correm o risco de doença grave.

O tratamento de HCMV ativo em pessoas com sistemas imunitários debilitados é feito atualmente com agentes antivirais, tais como ganciclovir, foscarnet, e cidofovir.

Os vírus da gripe causam a gripe, uma doença contagiosa que infecta o trato respiratório (nariz, garganta e pulmões) em humanos. A gripe geralmente vem de repente e pode incluir estes sintomas: febre, dor de cabeça, mal-estar, (A sensação de estar doente e sem energia que pode ser extrema), tosse, dor de garganta, congestão nasal e dores no corpo.

Os vírus paramixoviridae induzem uma ampla gama de doenças clinicamente distintas em seres humanos, estes incluem o vírus do sarampo, o vírus da papeira, que tem sintomas de parotidite, orquite e encefalite, e os vírus de parainfluenza que são agentes patogénicos respiratórios.

O vírus sincicial respiratório (RSV) é a causa mais comum de bronquiolite e pneumonia entre lactentes e crianças menores de 1 ano de idade. A doença começa mais frequentemente com febre, corrimento nasal, tosse e às vezes sibilação. O RSV também provoca infeções repetidas ao longo da vida, geralmente associadas a sintomas gripais moderados a graves, no entanto, a doença do trato respiratório inferior grave pode ocorrer em qualquer idade, especialmente entre os idosos

ou entre aqueles com comprometimento cardíaco, pulmonar, ou sistemas imune.

Os coronavírus infetam uma grande variedade de mamíferos e aves, em seres humanos causam infecções respiratórias, incluindo Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS). Infecções entéricas e síndromes neurológicas. Infecções em adultos são menos comuns e reinfeções parecem ocorrer ao longo da vida.

O Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) é um retrovírus. A informação genética de uma partícula retroviral é codificada por RNA. Após a entrada na célula hospedeira este RNA é copiado para o ADN pela transcriptase reversa da enzima do vírus. Esta cópia de cADN de informação genética do vírus pode integrar-se nos cromossomos das células hospedeiras no núcleo. Esse provírus pode manter-se inativo em muitas divisões celulares antes de ser reativado e produzir mais partículas de retrovírus infecciosas.

A hepatite viral é qualquer tipo de inflamação do fígado causada por uma infecção viral. Os três vírus mais comuns agora reconhecidos que causam doença do fígado são hepatite A, hepatite B e hepatite não-A, não-B (também chamada hepatite C). Vários outros tipos têm sido reconhecidos: hepatite D, hepatite E, e a recentemente identificada hepatite G. Um sétimo tipo (hepatite F) é suspeita, mas ainda não confirmada.

O rotavírus é a causa mais comum de diarreia grave entre as crianças, resultando na hospitalização de aproximadamente 55.000 crianças por ano nos Estados Unidos e da morte de mais de 600.000 crianças por ano em todo o mundo.

A Timosina alfa 1 é um composto bem conhecido no campo médico.

Este composto é um péptido ácido presente no extrato de timo que mostra propriedades imunomoduladoras *no ensaio em vivo e in vitro* ((1972; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69, 1800-1803)).

O uso prévio de Timosina alfa 1 já é conhecido.

A administração subcutânea de Timosina alfa 1 a camundongos previamente inoculados com cancro pulmonar ("NSCLC") significativamente diminui o volume do cancro.

As metástases pulmonares em camundongos com fibrossarcoma induzida por metilcolantreno foram também reduzidas por Timosina alfa 1, e o crescimento do sarcoma local, bem como metástases de fígado e pulmão de células linfossarcoma foram significativamente reduzidas em camundongos BALB/c tratados com Timosina alfa 1.

A PTX3 é uma proteína expressa em vários tipos de células (Bottazzi, et al, J. Biol Chem, 1997;. 272; 32.817-32.823), particularmente em fagócitos mononucleares e células endoteliais após a exposição a citocinas inflamatórias interleucina beta (IL-1beta) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa).

Esta proteína consiste em dois domínios estruturais, um terminal N não relacionado com qualquer molécula conhecida, e um terminal-C semelhante às pentraxinas curtas, tais como proteína reativa C (CRP). A similaridade substancial tem sido encontrada entre o PTX3 humano (hPTX3) e o PTX3s animal.

O gene PTX3 está localizado no cromossoma do camundongo 3, numa região semelhante à região 3q humana (q24-28), de acordo com a localização documentada de hPTX3 na região 3q 25. Além disso, o PTX3 de camundongo (mPTX3) (Introna, M., et al: Blood, 87 (1996);. 1862-1872) é muito semelhante ao hPTX3 sobre a base da organização, localização e sequência (Breviario, F., et al:. J. Biol. Chem., 267. 22190, 1992).

Em particular, o grau de identidade entre as sequências é de 82% entre o gene humano e o gene de camundongo, e atinge 92% se se considerar as substituições conservadoras.

O alto grau de similaridade entre a sequência de hPTX3 e de mPTX3 é um sinal de alto grau de conservação da pentraxina no decurso da evolução (Adv. Immunol 34: 141, 1983).

Para uma visão geral das pentraxinas, ver H. Gewurz, et al., Current Opinion in Immunology, 1995, 7. 54-64.

O uso prévio de pentraxina PTX3 longa já é conhecido.

O pedido de patente internacional W099/32516 descreve a utilização de pentraxina PTX3 longa para a terapia de doenças infecciosas (fungos, bactérias, protozoários ou vírus), doenças inflamatórias ou tumorais. Na W099/32516 nunca é mencionado que PTX3 teria sido útil para o tratamento de HCMV ou o vírus da gripe.

A W002/38169 descreve a utilização de pentraxina PTX3 longa para a preparação de um medicamento útil para o tratamento de doenças associadas com a ativação anormal do fator de crescimento FGF-2.

A W002/36151 descreve a utilização de pentraxina PTX3 longa para o tratamento de doenças autoimunes.

A W003/011326 descreve a utilização de pentraxina PTX3 longa para o tratamento de infertilidade feminina.

A W02005060997 descreve o uso de inibidores de longa pentraxina PTX3 para a preparação de um medicamento para a prevenção e tratamento de doenças autoimunes e de doenças degenerativas de ossos e cartilagens.

Blood, 1 January 2006, Volume 107, Number 1, descreve que PTX3 contribui para limitar o dano tecidual sob condições inflamatórias e as ativações de células auto-reativas.

O ganciclovir é um agente antiviral bem conhecido no campo médico. É usado para tratar infeções causadas por infeção por citomegalovírus em pessoas cujo sistema imunitário não está a funcionar plenamente. Isso inclui pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). É também usado para ajudar a prevenir a infeção por CMV em pacientes que recebem órgãos ou transplantes de medula óssea, bem como em pacientes com o vírus humano da imunodeficiência avançada (VIH).

Surpreendentemente e inesperadamente, verificou-se agora que a Timosina alfa 1, isoladamente ou em combinação com a pentraxina PTX3 longa ou Ganciclovir é útil para a preparação de um medicamento para a inibição da ativação do vírus herpes e/ou para a prevenção ou tratamento de doenças do vírus herpes.

É, portanto, um objecto do presente invenção a utilização de uma quantidade eficaz de Timosina alfa 1, isolada ou em combinação a pentraxina PTX3 longa, para preparar um

medicamento para a inibição do herpes de doenças virais, tais como o citomegalovírus (CMV), num sujeito mamífero.

É um outro objeto da presente invenção, a utilização de uma quantidade eficaz de Timosina alfa 1, isolada ou em combinação com a pentraxina PTX3 longa, para preparar um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de infeções pelo vírus do herpes, tais como o citomegalovírus (CMV); num sujeito mamífero.

É um outro objeto da presente invenção, a utilização de uma quantidade eficaz de Timosina alfa 1, isolada ou em combinação com a pentraxina PTX3 longa, para preparar um medicamento para o tratamento de uma síndrome induzido pelo citomegalovírus, no qual:

- a referida síndrome é mononucleose de CMV;
- a referida síndrome é associada a um hospedeiro imunocomprometido;
- o referido hospedeiro imunocomprometido tem SIDA;
- o referido hospedeiro imunocomprometido é um recipiente de transplante de órgão.

Os seguintes exemplos, não limitativos, ilustram a invenção.

DISCUSSÃO DOS DESENHOS:

FIGURA 1.

Tα1 Protege da infeção de MCMV *in vivo*

Os camundongos BALB/c (Figura 1a) e C57BL6 (Figura 1b) foram infetados com 1×10^5 ou 5×10^5 de PFU de MCMV, respetivamente. Os títulos de vírus foram quantificados em células MEF por

ensaio de placa padrão em tecidos removidos em diferentes tempos (Figura 1a) ou uma semana após a infecção (Figura 1b) e expressaram-se como \log_{10} (média \pm erros padrão, SE). Timosina alfa 1 (200 $\mu\text{g/kg}$ administrada durante 7 ou 14 dias) e GCV (40 mg/kg administrados três vezes por semana) foram administrados começando no dia da infecção. Os controles receberam o péptido codificado. Os resultados são representativos de 4 experiências independentes. As barras indicam os erros padrão. * $P < 0.05$, carga viral entre camundongos tratados e não tratados.

FIGURA 2.

T α 1 promove reatividade celular NK em infecção por MCMV

A análise fenotípica das células totais (Figura 2a, Figura 2b) ou NK (Figura 2c) a partir do baço de camundongos BALB/c infectados com MCMV não tratados (-) ou tratados (+) com 200 $\mu\text{g/kg}$ Timosina alfa 1 durante uma semana; Nenhum representa camundongos não infectados. Os números referem-se à percentagem de células positivas na análise de FACS, uma semana após a infecção. Os histogramas são representativos de 1 de 4 experiências independentes. (Figura 2d) A atividade citotóxica (mediante ensaio de libertação de ^{51}Cr padrão contra objetivos YAC-1) e frequência de células NK que produzem IFN mediante ensaio ELISPOT de camundongos tratados como acima. As barras indicam os erros padrão. * $P < 0.05$, os camundongos infectados vs não infectados. ** $P < 0.05$, camundongos tratados com Timosina alfa 1 contra camundongos infectados não tratados. Os resultados mostrados são a partir de 5 experiências independentes.

FIGURA 3

A Timosina alfa 1 promove a replicação viral, ativação de IRF7 e produção de citocinas em pDC

(Figura 3a) CD11b + DC ou pDC foram gerados a partir de medula óssea de camundongos BALB/c, infectados com MCMV e avaliados quanto à morfologia por luz microscopia e replicação viral mediante PCR em tempo real de expressão de transcrições gB de MCMV (ambos a 48 h) ou para expressão nuclear de IRF7 por imunotransferência com anti-IRF7 (2h depois). As células foram expostas (+) ou não (-) a 50µg/ml Timosina alfa 1 durante 2h a 37°C antes da infecção. - representa células não infectadas. Os resultados apresentados representam uma experiência representativa de 3.

Fracionamento nuclear foi verificado mediante transferência com anti-corpos de anti-aldolase (como controlo negativo).

A seta indica uma banda induzível. Pista 1, células não infectadas; pista 2 infectadas por MCMV; pista 3, tratados com Timosina alfa 1; faixa 4, tratados com MCMV + Timosina alfa 1. (Figura 3b) A produção de citocinas (pg/ml) por subconjuntos DC tratados como acima. As barras indicam os erros padrão. *P<0.05, produção de citocina em DC infectados com MCMV vs DC não infectados. **P<0.05, tratados com Timosina alfa 1 vs DC não tratados. (Figura 3c) A produção de citocina em camundongos durante a infecção com MCMV. Os níveis de citocinas (pg/ml) sobrenadantes em cultura de células do baço de camundongos com infecção MCMV e tratados durante uma semana com Timosina alfa 1 ou GCV. *P <0.05, camundongos tratados vs não tratados. ND, não feito.

A FIGURA 4

Tα1 ativa a trajetória dependente de TLR9/MyD88.

A carga viral (Figura 4a) e produção de citocina (Figura 4b) em camundongos C57BL6, TLR4-/-, TLR9-/- e MyD88-/- infectados com 5×10^5 PFU de MCMV e tratados com 200 µg/kg Tα1 durante uma semana. Os títulos de vírus, expressos como log10, foram quantificados nas células MEF pela norma de ensaio de placa nos tecidos infectados removidos uma semana após infecção e tratamento. Os níveis de citocina (pg/ml), em cultura sobrenadante de células de baço foram determinados por ensaio ELISA. As barras indicam os erros padrão. *P<0.05, camundongos tratados com Tα1 vs não tratados. Os resultados são representativos de 3 experiências independentes.

FIGURA 5 – exemplo de referência

Timosina alfa 1 é eficaz em combinação com GCV.

Foram infectados camundongos BALB/c ou C57BL6 com 10^5 ou 5×10^5 PFU de MCMV, respectivamente. Títulos de vírus, expressos como log10, foram quantificados em células MEF pela norma ensaio de placa sobre os tecidos do pulmão removidos 7 dias após a infecção. Tα1 (200 µg/kg/dia durante uma semana) e/ou GCV (40mg/kg, três vezes por semana) foram administradas começando no dia da infecção. Os níveis de citocina (pg/ml), em sobrenadantes de cultura de células de baço (7 dias), foram determinados por ensaio ELISA. As barras indicam os erros padrão. *P<0.05, camundongos tratados vs não tratados. Os resultados são representativos de 3 experiências independentes.

FIGURA 6

Tα1 é eficaz em combinação com PTX3 em infecção com citomegalovírus de murino

Camundongos isogênicos C57BL6 e BALB/c foram injetados intraperitonealmente (ip) com 1×10^5 (BALB/c) ou 5×10^5 (C57BL6) unidades formadoras de placas (PFU) de MCMV. Títulos de vírus foram quantificados em células MEF por ensaio de placa padrão sobre os tecidos removidos um dia após o tratamento. Os tratamentos foram os seguintes: Tα1 (200mg/kg/ip) e PTX3 (1mg/k/ip) (SIGMA-Tau, Pomezia, Roma, Itália) foram dadas diariamente durante 7 dias consecutivos com início no dia da infecção. Os controlos receberam o péptido codificado. Todos órgãos de animais não infectados deram vírus negativos. Os títulos de vírus foram expressos como log10 (média ± erros de padrão, SE).

EXEMPLO 1

Materiais e Métodos

Camundongos. Camundongos C57BL6 e BALB/c do tipo selvagem (WT) entre 8 a 12 semanas de idade, foram adquiridos a Charles River Breeding Laboratoires (Calco, Itália). Pares de camundongos homozigotos TLR9-(TLR9-/-), TLR4-(TLR4-/-), e deficientes MyD88-(MyD88-/-) (nos antecedentes de C57BL6) foram criados em determinadas condições livres de patógenos nas instalações de criação da Universidade de Perugia, Perugia, Itália. Os ensaios foram realizados seguindo os protocolos aprovados pelo comité institucional animal e de acordo com Diretiva do Conselho da Comunidade Económica Europeia, bem como instituição de cuidados com os animais e suas orientações.

Vírus, infecção e tratamentos. Reservas de extratos de glândulas salivares MCMV de estirpe Smith foram preparadas a partir de camundongos BALB/c e titulados num ensaio de placa padrão em células fibroblastas (MEF) embrionárias de murino BALB/c (J. Gen. Virol. 2002; 83:2983-2993). Os camundongos foram injetados por via intraperitoneal (i.p.) com 1×10^5 (BALB/c) ou 5×10^5 (C57BL6) unidades formadoras de placas (PFU) de MCMV. Os títulos de vírus foram quantificados em células MEF pelo ensaio de placa padrão em tecidos removidos em tempos diferentes. Os tratamentos foram como se segue: A Timosina alfa 1 e polipéptido codificado (ambos da SciClone Pharmaceuticals, San Mateo, CA) foram fornecidos como polipéptido acetilado, liofilizado, estéril, purificado (os níveis de endotoxina foram de <0.03 pg/ml, por um ensaio de lisado de Limulus padrão). As sequências foram as seguintes: Ac-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn-O (T α 1) e Ac-Ala-Lys-Ser-Asp-Val-Lys-Ala-Glu-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Asp-Thr-Thr-Glu-Leu-Asp-Glu-Lys-Val-Glu-Val-Lys-Ala-Asn-Glu-OH (péptido codificado). Os pós liofilizados foram reconstituídos em água estéril e foram administrados 200µg/kg/i.p. diariamente durante 7 ou 14 dias consecutivos, começando no dia da infecção. Ganciclovir (GCV) (Cymevene; de Recordati, Milão, Itália) foi administrado a 40 mg/kg/i.p., três vezes por semana, cada outro dia, começando 6 h após a infecção. Os controlos receberam o péptido codificado ou o diluente isolado.

Geração de subconjunto DC. Foram obtidos DC ao cultivar células da medula óssea BALB/c 10^6 /ml em meio modificado de Iscove, contendo 10% de soro de bovino filtrado, 50 µM 2-mercaptoetanol, piruvato de sódio (1 mM), 2 mM de L-glutamina, HEPES (10 mM), e 50 µg/ml de gentamicina na

presença de 150 U/ml de camundongo rGM-CSF (Sigma) e 75 U/ml rIL-4 (R+D Systems), durante 7 dias para obter CD11b+DC ou 200 ng/ml de FLT3-L (Immunex Corporation, Seattle, WA) durante 9 dias para se obter pDC. A maturação final foi realizada pela adição de 1 µg/ml de LPS ou 2 µg/ml de oligodesoxinucleótido de citosina fosforotioato-guanina (CpG-B ODN 1668) (Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, MA) durante 24h adicionais para CD 11b+DC ou PDC, respetivamente (Blood 2003; 102: 3807-344, 3814) foram discriminados CD11b + DC em expressão alta CD11c e foram distintamente compostos por CD8a + DC e CD11b + DC. Foram definidos pDC como células CD11cbaixas, Ly6C +, CD8a +/- . Fotografias foram tiradas usando uma Câmera a Cores de alta resolução Microscopia AxioCam, utilizando o Software AxioVision Rel. 3.1 (Carl Zeiss SpA, Milano, Itália).

As análises de citometria de fluxo. Após o bloqueio de FcRs com o anticorpo anti-CD16/32 (2.4G2), as células foram analisadas para a expressão de antigénio com um citofluorometro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) equipado com software CELLQuest™. Coloração de controlo de células com Ab irrelevante foi utilizada para obter valores de fluorescência antecedentes. Abs foram de PharMingen.

Ensaio de placa. Ensaio de placa foi determinado em células cultivadas para subconfluência e incubadas com amostras de vírus diluídos durante 2h, a 37°C (10). Todos os órgãos dos animais não infetados foram negativos a vírus. Títulos de vírus são expressos como log10 (média ± erro padrão, SE).

Inibição da replicação viral. foram pré-incubados DC (10⁶/cavidade) durante 2h a 37°C com 50µg/ml Timosina alfa 1

diluída em DMEM isento de soro e, em seguida, adicionados 10^5 PFU MCMV. A infetividade foi medida 48h mais tarde.

A atividade citotóxica em células NK . As células NK, purificadas a partir de baços mediante micropérolas DX5 (Miltenyi Biotec), foram definidas como células NK1.1 + CD3. Atividade citolítica NK foi avaliada contra 51 células de linfoma YAC-1 etiquetado Cr (Blood 2005; 106:4397-4406).

A análise de imunotransferência de IRF7. Foram expostos DC de 2 a 50 $\mu\text{g/ml}$ de Timosina alfa 1 ou 10^5 PFU de MCMV, isoladamente ou em combinação. Os extratos nucleares foram preparados com nucleares reagentes NE-PER e extração citoplasmática (Pierce, Celbio Srl, Milão, Itália) e a concentração de proteína dos extractos nucleares foi determinada com um kit de ensaio de proteína BCA-200 (Pierce) seguindo as instruções do fabricante. O conteúdo nuclear de IRF7 foi determinado pelo método Western utilizando anticorpo anti-IRF7 (H246) de coelho e peroxidase de rábano anti coelho (Santa Cruz Biotechnology). A visualização foi realizada com o sistema de análise de transferência Western ECL de Amersham e películas Kodak Biomax.

RT-PCR em tempo real para a quantificação de mRNA de MCMV. Um ensaio altamente sensível RT-PCR foi utilizado para a amplificação do segmento 356-bp de DNA de glicoproteína B de MCMV (gB) de ARN celular total (51). A síntese e PCR de ADNC foram realizados como descrito (Blood 2003; 102:3807-344 3814). Iniciadores de oligonucleótidos de ADN sintético foram selecionados a partir da sequência publicada do gene gB de MCMV (17). Os iniciadores de sentido foram baseados nono ADNC No. 2416-2443: 5'-AAG-CAG-CAC-ATC- CGC-ACC-CTG-AGC-GCC-3', e os anti-sentido em No. 2745-2772: 5'-CCA-GGC-GCT-CCC-GGC-

GGC-CCGCTC-TCG-3'. As condições cíclicas foram de desnaturação inicial durante 3 min a 95°C, seguido por ciclos de 1 min a 95° C, 1 min a 50° C, e 20 s, a 72° C, e uma extensão final durante 10 min a 72° C. A amplificação de PCR do gene de limpeza β -actina foi realizado para cada amostra para controlar a carga de amostra e permitir normalização entre amostras de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems).

Quantificação de citocinas através de ensaios ELISA e ELISPOT. Os níveis de citocinas nos sobrenadantes de cultura de células do baço, estimuladas com mitogénio (48h de estimulação com 10 μ g/ml de ConA) ou DC pulsado de MCMV (24h) foram determinados por ELISA (R&D Systems e PBL Biomedical Lab, Milan, Itália). Os limites de detecção (pg/ml) dos ensaios foram <16 para IL-12 p70, <10 para IFN-., <3 para IL-10 e <10 para IFN- α . IFN- γ . Células NK que produzem IFN- γ foram enumerados pelo ensaio ELISPOT em NK purificado (Vírus Res. 2003; 98:17-467 25). Os resultados são expressos como o número médio de células que produzem citocinas (\pm SE) por 10^5 de células, calculadas usando réplicas de diluições 2 em série de células.

Análises estatísticas. A avaliação t complementada por estudantes foi utilizada para determinar o significado de valores em grupos experimentais (o significado foi definido como $P < 0.05$). Dados de sobrevivência foram analisados utilizando o teste U de Mann-Whitney. Os grupos in vivo consistiram em 6 animais. Salvo indicação em contrário, os dados são médios \pm SE.

RESULTADOS

Timosina alfa 1 protege da infecção MCMV. Os efeitos da administração de Timosina alfa 1 na infecção primária com MCMV aguda de quaisquer camundongos suscetíveis (BALB/c) ou resistentes (C57BL6) foram avaliados. Camundongos foram infectados com uma dose subletal de MCMV, tratados com Timosina alfa 1 ou GCV e as titulações no baço, fígado, pulmão e glândula salivar foram determinados em semanas diferentes após a infecção mediante titulação de ensaio de placa padrão. O MCMV replicado para títulos mais altos nos órgãos viscerais de camundongos suscetíveis (Figura 1a) do que nos resistentes (Figura 1b), particularmente na fase precoce da infecção. A Timosina alfa 1, administrada a 200 µg/kg durante 7 dias, mas não o péptido codificado, diminuiu significativamente a carga viral em diferentes órgãos viscerais, em ambos camundongos, os suscetíveis e os resistentes. O efeito foi semelhante ao de GCV e foi superior com Timosina alfa 1 administrada durante 14 dias. Em camundongos resistentes, o efeito da Timosina alfa 1 foi particularmente evidente na glândula salivar e fígado (Figura 1b). A Timosina alfa 1 também diminuiu significativamente a carga viral em camundongos BALB/c infectados com um PFU mais elevado (dados não mostrados). Estes resultados são a demonstração que a Timosina alfa 1 exerce um efeito terapêutico na infecção por MCMV.

A Timosina alfa 1 recupera reatividade NK e promove a produção de citocina na infecção por MCMV. As células NK Ly49H são articuladamente envolvidas no controlo da infecção por MCMV através de diferentes mecanismos, incluindo a regulação recíproca de CD8a+DC (4). O efeito de Timosina alfa 1 na expansão e atividade funcional de células NK no baço de camundongos infectados por MCMV foi avaliada. A Figura 2 mostra que o tratamento de uma semana com Timosina alfa 1,

apesar de não afetar a expansão das células CD4 + ou CD8 + (Figura 2a), expande as células NK + NK1.1 (Figura 2B). As células NK foram totalmente ativadas como revelado pelo aumento da expressão do marcador de ativação CD69 (Figura 2c). A frequência de células produtoras de IFN- γ e atividade citotóxica de células NK esplênicas purificadas ex-vivo foram também ambas significativamente reguladas pelo tratamento de Timosina alfa 1 (Figura 2d).

Timosina alfa 1 promove a infecção viral, ativação de IRF7 e produção de citocina em pDC. Sempre que há ativação precoce das células NK em infecção MCMV é mediada por IFN- α/β que promove a citotoxicidade e proliferação de células NK, e IL-12 que induz a produção de IFN. (Nat. Immunol. 2001, 2: 1144-1150; An. J. Immunol. 1996; 156:1138-1142), o padrão de produção de citocinas mediante subconjuntos de DC expostos a MCMV na presença de Timosina alfa 1 foi avaliado. A infecção aguda com MCMV induziu uma passageira, mas profunda imunossupressão, em sensíveis camundongos BALB/c, que pode ser ligado à infecção de CD11b+DC (Nat. Immunol. 2001; 2: 1077-1084). CD11b+DC suporta a infecção produtiva de MCMV tanto *in vitro* como *in vivo* (Nat. Immunol. 2001; 2: 1077-1084), enquanto MCMV não replicar em pDC (J. Exp. Med. 2003; 197:885-898; J. Exp. Med. 2002; 195:517-528). Para CD11b+DC derivado da medula óssea ou subconjuntos de pDC de camundongos não infetados recorreu-se e foi diretamente avaliado o efeito da Timosina alfa 1 na produção de citocina por e replicação viral nos diferente subconjuntos de DC. Em consonância com estudos anteriores (Nat. Immunol. 2001, 2: 1077-1084; Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 2004; 101:3516-3521), MCMV replicado em CD11b + DC, mas não em pDC. Curiosamente, a replicação viral não foi afetada por Timosina alfa 1 em CD11b + DC, mas foi realmente promovida em PDC (Figura 3a). Sabe-se

que HCMV elicia uma resposta antiviral celular coordenada para a produção de interferon que inclui a ativação temporal de IRF3 e IRF7 que resulta em acumulação nuclear destes fatores. Como IRF7 é o regulador principal de produção de IFN tipo 1 antiviral em pDC, os níveis de expressão IRF7 nuclear em ambos os subgrupos DC sobre vírus e/ou Timosina alfa 1 por imunotransferência com anticorpo anti-IRF7 foram medidos. Notou-se a translocação de IRF7 quer sobre sua exposição viral ou Timosina alfa 1, quer isoladamente ou em combinação com pDC mas não em CD11b+CC (Figura 3a). Também foi avaliada fosforilação e translocação de IRF3 e foi encontrado ativado em CD11b+DC após exposição isoladamente ou em conjunto com A Timosina alfa 1, mas não detectada em pDC (dados não mostrados). Em termos de produção de citocina, ambos subconjuntos DC produzem IFN-**a** e IL-12p70 em resposta ao vírus, como já é conhecido, embora pDC mais de que CD11b+DC. No entanto, o pré-tratamento de pDC com Timosina alfa 1 aumentou grandemente a produção de IFN-a, ao passo que não afetam o IL-12p70. Curiosamente, Timosina alfa 1 promove ligeiramente IFN-a mediante CD11b+DC (Figura 3b). Estes dados são a demonstração de que Timosina alfa 1 promove o programa antiviral dependente IRF7 em pDC. Para correlacionar o padrão de produção de citocinas *in vitro* com a que ocorre *in vivo*, a produção de IL-12p70, IFN-a, IFN γ e IL-10 em culturas sobrenadantes de células de baço de camundongos BALB/c com infecção MCMV e tratada com Timosina alfa 1 foi medida. Verificou-se que o tratamento com Timosina alfa 1 aumentou significativamente produções de IFN-a e IFN γ , particularmente nas primeiras semanas da infecção. IL-12p70 foi também ligeiramente aumentada logo após o tratamento, para declinar daí em diante. Estes efeitos foram comparáveis àqueles obtidos com GCV. Curiosamente, a Timosina alfa 1 também aumentou dramaticamente a produção de IL-10 (Figura

3c). Em conjunto, estes dados mostram que Timosina alfa 1 favorece a ativação das trajetórias dependentes de IFN α /IFN γ em resposta a MCMV.

Timosina alfa 1 ativa a trajetória dependente de TLR9/MyD88. Vigilância imunitária anti-MCMV efetiva requer sinais TLR funcionais em particular, a trajetória de sinalização TLR9/MyD88 tem um papel crucial para o programa antiviral dependente de IRF7 (27) e uma rápida depuração de MCMV, enquanto TLR2, TLR3, e TLR4 não parecem desempenhar um papel significativo (J. Immunol. 2005; 175:6723-6732). Para avaliar o envolvimento de TLR no efeito da Timosina alfa 1 na infecção, camundongos deficientes TLR foram desafiados com MCMV, tratados com Timosina alfa 1 e de seguida por replicação viral. De acordo com dados publicados (J. Immunol. 2005.; 175:6723-6732), camundongos TLR9 $^{-/-}$ e, em particular, MyD88 $^{-/-}$ foram mais suscetíveis ao MCMV que camundongos C57BL6, enquanto a deficiência de TLR4 não afetou significativamente a resistência do camundongo (Figura 4a). A Timosina alfa 1 foi eficaz em camundongos C57BL6 e em TLR4 $^{-/-}$, mas completamente ineficaz em camundongos TLR9 $^{-/-}$ e MyD88 $^{-/-}$, uma constatação que sugere a inclusão da sinalização dependente de TLR9/MyD88 na atividade antiviral de Timosina alfa 1. Aqui novamente, a eficácia da Timosina alfa 1 diretamente correlacionada com a produção de IFN α mais de que IL-12p70, e IFN γ . cujos níveis estavam significativamente aumentados em sobrenadantes de esplenócitos de camundongos C57BL6 e TLR4 $^{-/-}$ mas não camundongos TLR9 $^{-/-}$ ou MyD88 (Figura 4b).

EXEMPLO 2 - exemplo de referência

A Timosina alfa 1 é sinérgica em combinação com GCV.

Usando os métodos descritos no Exemplo 1 foi avaliado se Timosina alfa 1 poderia trabalhar em conjunto com GCV. Para esta finalidade, camundongos sensíveis ou resistente infectados com MCMV foram tratados concomitantemente durante uma semana com GCV e/ou Timosina alfa 1 e avaliados para os títulos virais e padrões de produção de citocina. Os resultados preliminares mostram que esta combinação é sinérgica na diminuição dos títulos virais no pulmão de um ou outro tipo de camundongos e promoveu a produção de IFN- α e IFN- γ .

EXEMPLO 3

A Timosina alfa 1 é sinérgica em combinação com PTX3

Usando os métodos descrito no Exemplo 1 foi avaliado se Timosina alfa 1 poderia trabalhar em conjunto com PTX3.

Para esta finalidade, camundongos suscetíveis (BALB/c) ou resistentes (C57BL6) infectados com MCMV foram concomitantemente tratados durante uma semana com PTX3 e/ou Timosina alfa 1 e avaliados pelos títulos virais nos pulmões. Os resultados (Figura 6) confirmaram que qualquer dos agentes isolados diminuiu os títulos virais no pulmão de ambos os tipos de camundongos. Além disso, surpreendentemente tanto em camundongos suscetíveis ou resistentes, a combinação dos ingredientes ativos exibiram um inesperado sinergismo, em termos de restrição de replicação viral e em termos de produção de IFN- α e IFN- γ , IL-12p70 e IFN- γ .

A presente invenção contempla um pacote terapêutico para a distribuição a um, ou para utilização em distribuição, paciente a ser tratado a uma doença do vírus do herpes (ou

para a inibição da ativação do vírus herpes) compreendendo uma ou mais doses unitárias, cada dose unitária que compreende uma quantidade de Timosina alfa 1 e, opcionalmente, uma quantidade da pentraxina PTX3 longa de modo a que a administração periódica de uma ou mais das referidas unidades de dosagem seja eficaz para tratar, por exemplo, HCMV, e um recipiente farmacêutico final por conseguinte, o referido recipiente contendo ainda ou compreendendo rotulagem, indicando a referida rotulagem que a Timosina alfa 1 e, opcionalmente, a pentraxina PTX3 longa, é indicada para o tratamento de pacientes com, por exemplo, HCMV.

Além disso, a presente invenção contempla um artigo de fabrico compreendendo material de embalagem e Timosina alfa 1 e, opcionalmente, a pentraxina PTX3 longa, contida dentro do referido material de embalagem, em que a pentraxina PTX3 longa é terapeuticamente eficaz para o tratamento de HCMV, e em que o material de embalagem compreende um rótulo que indica que a pentraxina PTX3 longa pode ser usada para tratar o HCMV.

De acordo com a presente invenção a Timosina alfa 1 e, opcionalmente, a pentraxina PTX3 longa podem ser administradas de modo separado ou sob a forma de uma dose unitária que compreende os ingredientes activos e opcionalmente diluente ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

De acordo com a presente invenção, quando a Timosina alfa 1 e a pentraxina PTX3 longa são administrados separadamente (i.e. 2 administrações diferente), os referidos ingredientes ativos podem ser administrados sequencialmente (isto é, no mesmo

momento) ou sequencialmente de acordo com uma tabela sugerida na rotulagem acima mencionada.

Na utilização de acordo com a invenção, os termos "tratar" ou "tratamento" têm o seu significado habitual, que inclui prevenir, proibir, aliviar, inibir, melhorar, travar, restringir, retardar ou reverter a progressão de ativação, ou redução da gravidade da doença de vírus do herpes.

Na utilização de acordo com a invenção, o termo "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade do composto, que é capaz de realizar o resultado pretendido. Por exemplo, uma quantidade eficaz de Timosina alfa 1, e opcionalmente, a pentraxina PTX3 longa, que é administrada, num esforço para tratar a doença do vírus do herpes é essa a quantidade que é necessária para prevenir, proibir, aliviar, melhorar, interromper, restringir, retardar ou reverter a progressão, ou reduzir a gravidade da referida doença do vírus do herpes, e a dose diária a ser administrada vai depender, de acordo com o julgamento do médico, do peso idade e condição geral do paciente.

A presente invenção também inclui métodos empregando formulações farmacêuticas, que contêm, como o ingrediente activo, Timosina alfa 1, e opcionalmente a pentraxina PTX3 longa ou ganciclovir, em associação com transportadores farmacêuticos. Um técnico hábil saberá tais formulações e seu fabrico, ver, por exemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, (16^a ed.1980).

As formulações são preferencialmente formuladas numa forma de dosagem unitária do ingrediente activo. O termo "forma de dosagem unitária" refere-se a unidades fisicamente discretas

adequadas como dosagens unitárias para sujeitos humanos, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de Timosina alfa 1, e, opcionalmente, de pentraxina PTX3 longa, calculada para produzir o efeito terapêutico desejado, em associação com um excipiente farmacêutico adequado.

Timosina alfa 1 e, opcionalmente, a pentraxina PTX3 longa podem ser administrados sob a forma de uma composição farmacêutica em combinação com transportadores farmaceuticamente aceitáveis ou excipientes, a proporção e natureza dos quais são determinadas pela solubilidade e propriedades químicas do composto nos transportadores e/ou excipientes selecionados, a via de administração escolhida, e prática farmacêutica padrão.

As composições farmacêuticas são preparadas de uma maneira bem conhecida na técnica farmacêutica ver, e.g., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, (16^a ed. 1980).

O transportador ou excipiente pode ser um sólido, semi-sólido, ou material líquido, que pode servir como veículo ou meio para o ingrediente ativo. Transportadores ou excipientes adequados são bem conhecidos na técnica. A composição farmacêutica pode ser adaptada para via oral, inalação, utilização parentérica, ou tópica e pode ser administrada para ao paciente sob a forma de comprimidos, cápsulas, aerossóis, inalantes, supositórios, solução, suspensões, lipossomas ou semelhantes.

10-08-2012

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização da Timosina alfa 1, para a preparação de um medicamento para a prevenção e/ou tratamento de doenças causadas pelo vírus do herpes num sujeito mamífero.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a Timosina alfa 1 é em combinação com pentraxina PTX3 longa.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o vírus do herpes é o citomegalovírus (CMV).

4. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, para o tratamento de um síndrome induzida pelo citomegalovírus na qual:

- a referida síndrome é mononucleose CMV;
- a referida síndrome está associada a um hospedeiro imunocomprometido;
- o referido hospedeiro imunocomprometido tem SIDA;
- o referido hospedeiro imunocomprometido é um destinatário de um órgão transplantado.

10-08-2012

1/6

Figura 1

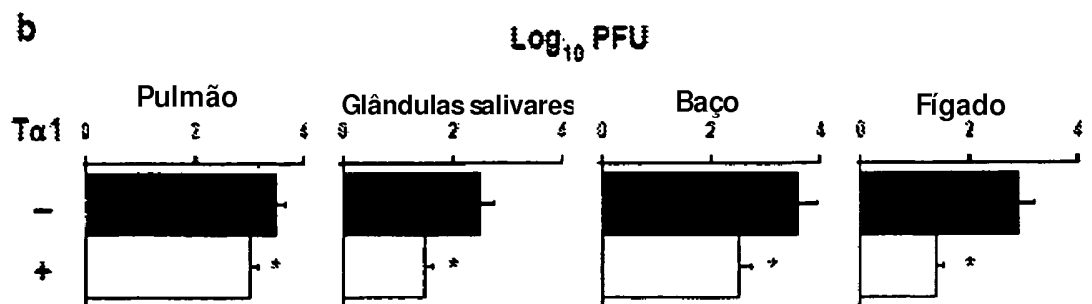
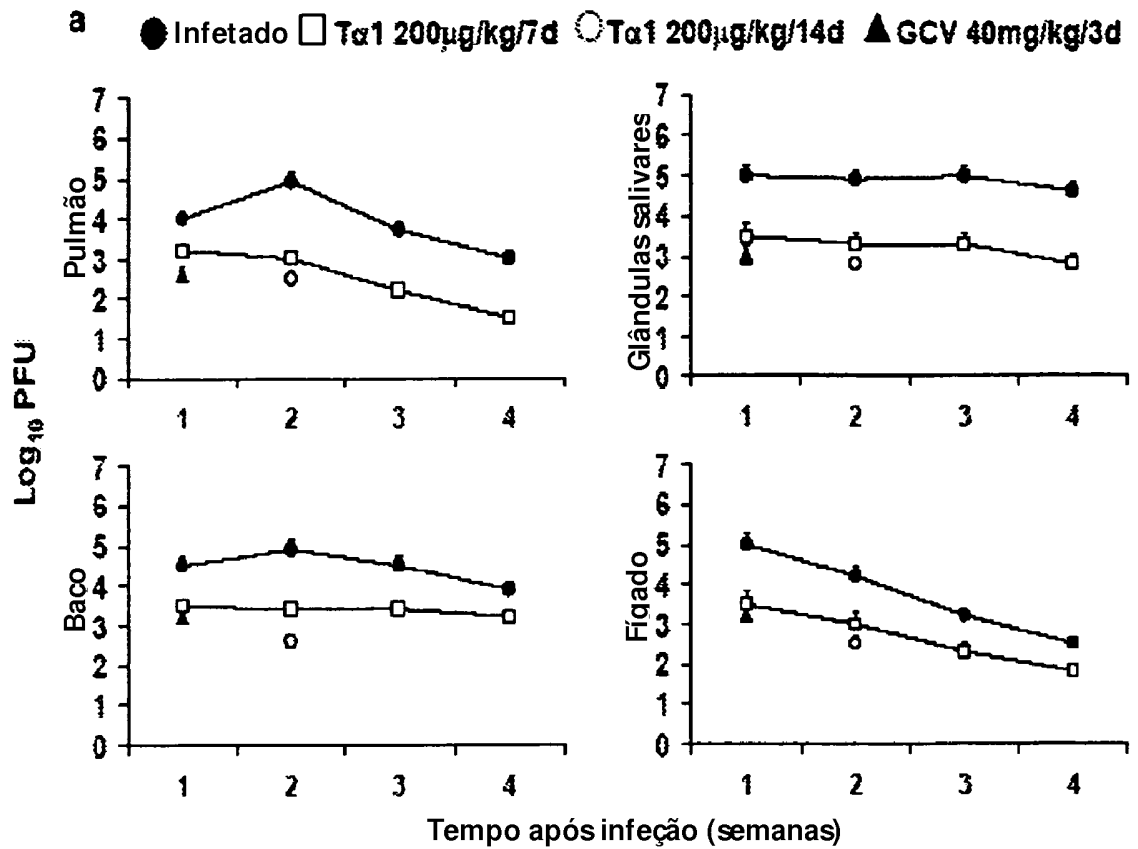


Figura 2

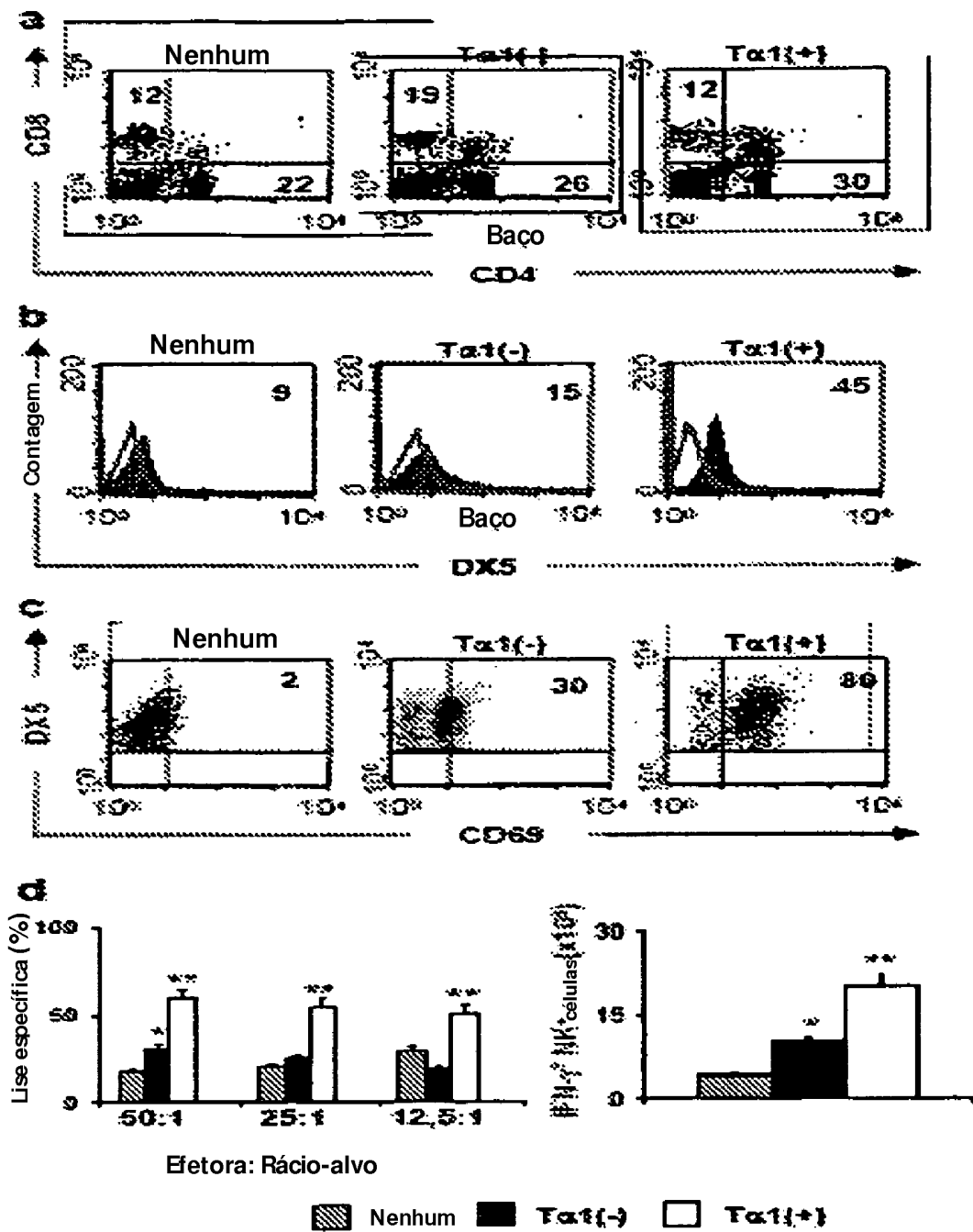


Figura 3

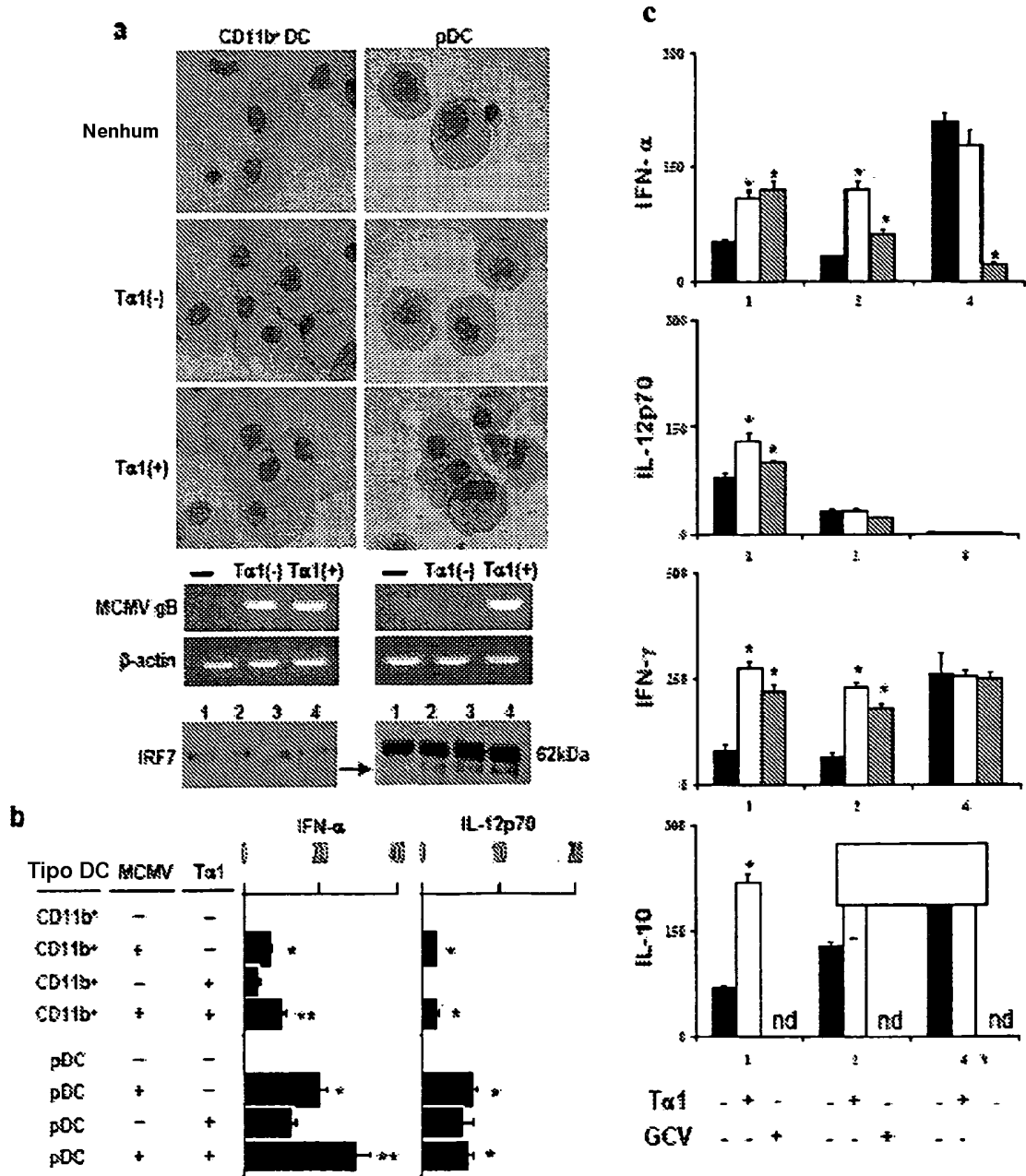


Figura 4

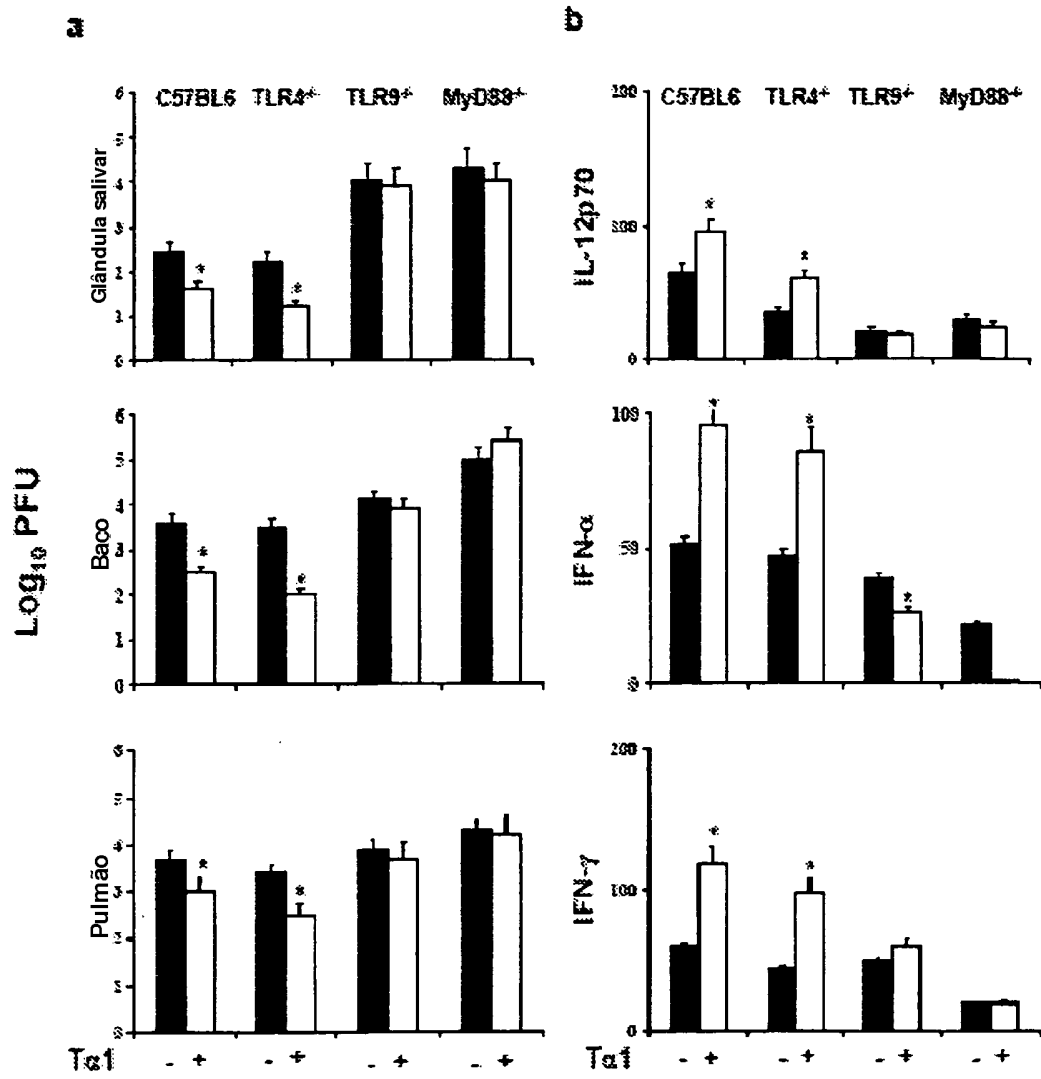


Figura 5

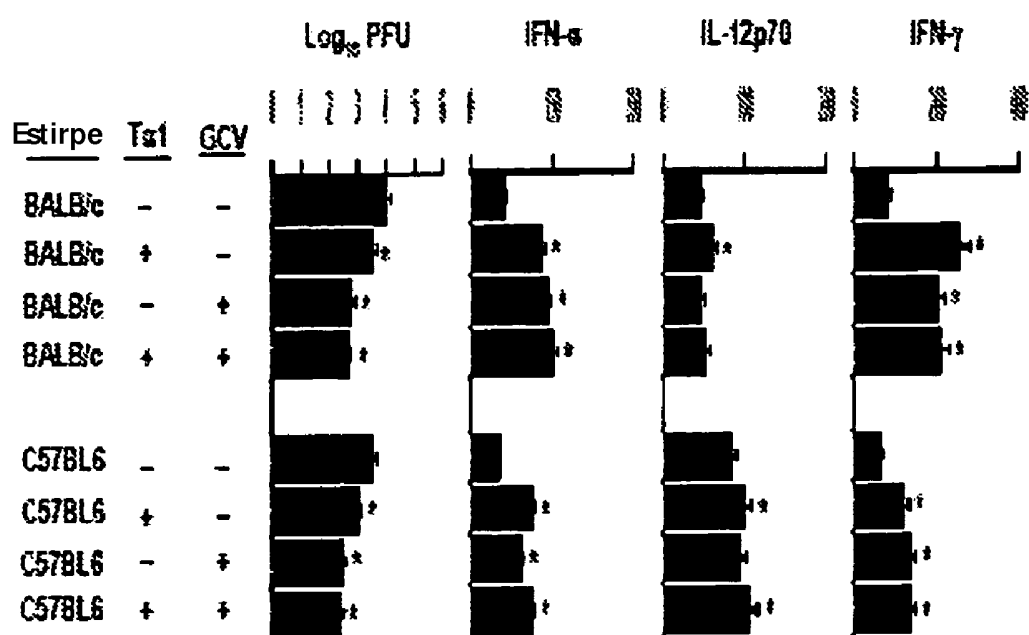
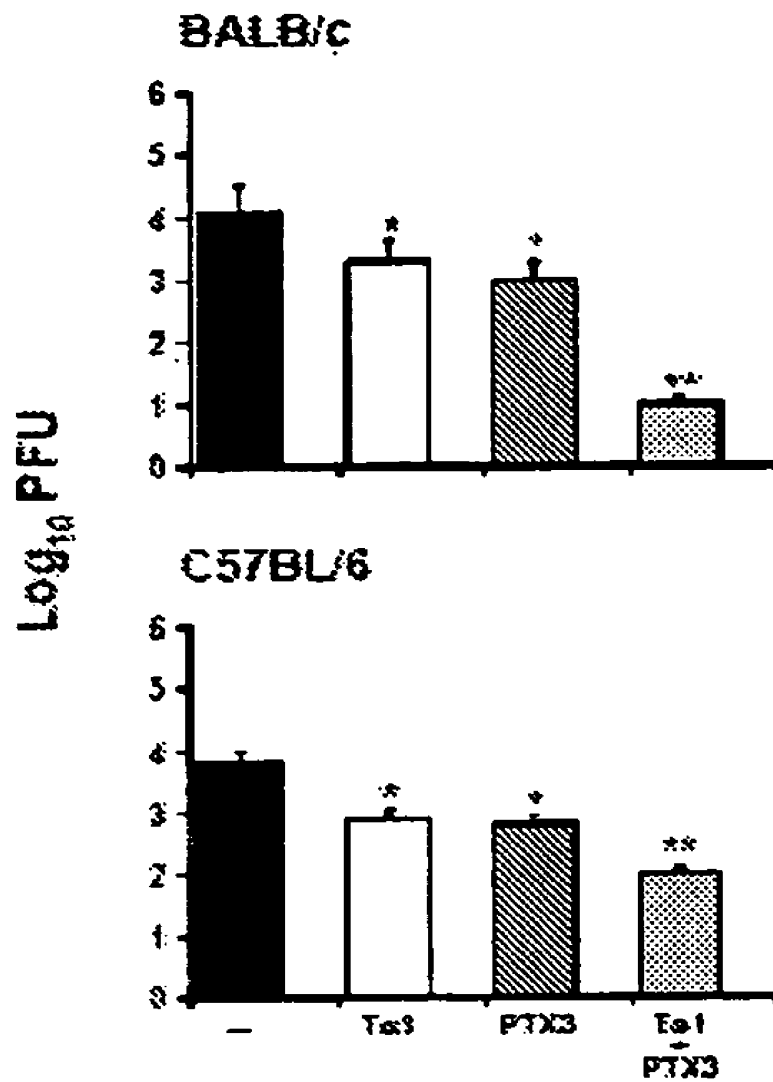


Figura 6





European Patent Office
80298 MUNICH
GERMANY
Tel. +49 (0)89 2399 - 0
Fax +49 (0)89 2399 - 4465



Spadaro, Marco
Cantaluppi & Partners
Viale della Tecnica, 205
00144 Roma
ITALIE

**For any questions about
this communication:**
Tel.: +31 (0)70 340 45 00

Date

01.06.12

Reference 08141MS	Application No./Patent No. 07728041.0 - 2107 / 2012816
Applicant/Proprietor SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.	

Decision to grant a European patent pursuant to Article 97(1) EPC

Following examination of European patent application No. 07728041.0 a European patent with the title and the supporting documents indicated in the communication pursuant to Rule 71(3) EPC dated 13.12.11 is hereby granted in respect of the designated Contracting States.

The request for amendments received at the EPO on 20.04.12 and any subsequent modifications agreed with the applicant have been taken into account.

Patent No. : 2012816
Date of filing : 12.04.07
Priority claimed : 02.05.06/EPA 06113401

Designated Contracting States
and Proprietor(s) : AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI LT LU
LV MC MT NL PL PT RO SE SI SK TR
SIGMA-TAU
Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.
Viale Shakespeare 47
00144 Roma/IT

This decision will take effect on the date on which the European Patent Bulletin mentions the grant (Art. 97(3) EPC).

The mention of the grant will be published in European Patent Bulletin 12/26 of 27.06.12.

Examining Division

Engl B

Schnack A

Boehmerova E

