



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 302 402**

② Número de solicitud: 200501468

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)  
**C07K 14/56** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **16.06.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2008**

Fecha de la concesión: **20.04.2009**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **08.05.2009**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente: **08.05.2009**

⑰ Titular/es:  
**PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.**  
**Avda. Carlos III, nº 36 - 1º Dcha.**  
**31003 Pamplona, Navarra, ES**

⑱ Inventor/es: **Aldabe Arregui, Rafael;**  
**Larrea Leoz, Esther;**  
**Civeira Murillo, María Pilar y**  
**Prieto Valtueña, Jesús**

⑲ Agente: **Ungría López, Javier**

⑳ Título: **Uso de una citoquina de la familia de interleuquina-6 en la preparación de una composición para administración combinada con interferón-alfa.**

㉑ Resumen:

Uso de una citoquina de la familia de interleuquina-6 en la preparación de una composición para administración combinada con interferón-alfa.

La presente invención se refiere al uso de al menos una citoquina de la familia IL-6 -familia gp130 - o una secuencia de ADN que la codifica, en la preparación de una composición farmacéutica para la administración combinada con al menos un interferón-alfa o una secuencia de ADN que lo codifica, en el tratamiento de enfermedades virales; a una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos una citoquina de la familia IL-6 - familia gp130 -, o una secuencia de ADN que la codifica, y una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos un interferón-alfa, o una secuencia de ADN que lo codifica, a un kit farmacéutico y a un método para tratar enfermedades virales mediante la administración combinada de las citoquinas mencionadas y el interferón-alfa.

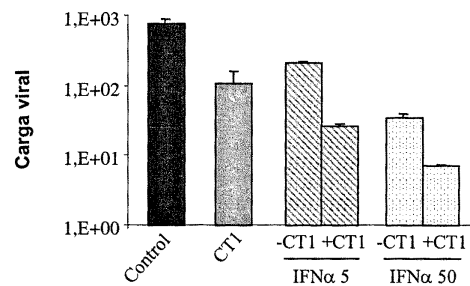


Figura 3

ES 2 302 402 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Uso de una citoquina de la familia de interleuquina-6 en la preparación de una composición para administración combinada con interferón-alfa.

La presente invención se refiere al uso de una citoquina en combinación con un interferón para la preparación de composiciones para el tratamiento de enfermedades virales.

**Estado de la técnica**

El sistema interferón (IFN) es la primera línea de defensa contra infecciones víricas en mamíferos. Los interferones de tipo I (que incluye varios subtipos de IFN-alfa así como IFN-beta) son moléculas con actividad antiviral que son inducidas en células de mamífero en respuesta a infecciones víricas. La acción del IFN-alfa es mediada por la interacción con una multisubunidad de receptor celular de superficie, que consiste en dos subunidades receptoras, receptor 1 IFN-alfa (IFNAR1) y IFNAR2. Se ha identificado sólo una forma de cadena de IFNAR1; y tres variantes de la subunidad IFNAR2 han sido reconocidas: una de longitud total, IFNAR2c, y dos isoformas truncadas IFNAR2b y IFNAR2a. La variante IFNAR2c está implicada en uniones a ligandos y transducción de señales, mientras que las dos formas truncadas IFNAR2b y IFNAR2a - que no tienen dominios intracelulares - inhiben la señal de IFN-alfa, mediante la competencia con IFNAR2c por la unión a IFN-alfa.

La cascada de señalización de IFN-alfa se inicia cuando IFN-alfa se une al receptor. La unión de IFN-alfa al receptor conduce a la activación de tirosín-quinasa asociadas a IFNAR (Janus quinasa 1 (Jak1) y tirosín-quinasa 2 (Tyk2)), las cuales fosforilan ambas subunidades IFNAR1 y IFNAR2. IFNAR1 fosforilada proporciona un sitio de unión para el activador del factor de transcripción 2 y transductor de la señal que contiene un dominio de homología 2 con Src (STAT2), cuando es fosforilado por Tyk2 o Jak1. Los otros STATs, incluyendo STAT1, STAT3 y STAT5, consiguientemente son reclutados al receptor para su fosforilación y activación. Los monómeros activados STAT1 y STAT2 son luego liberados de nuevo al citosol, donde forman heterodímeros y se unen al factor 9 de regulación del interferón/Proteína p48, para formar un complejo activo de factores de transcripción conocido como factor génico 3 estimulado por interferón (ISGF3). El complejo se transloca al núcleo y se une al elemento de respuesta a la estimulación con IFN (ISRE) para iniciar la transcripción de los genes diana, incluyendo algunas proteínas antivirales e inmunorreguladoras. IFN-alfa también induce la formación de otros complejos STAT, incluyendo STAT1/STAT1, STAT1/STAT3 y STAT3/STAT3, los cuales se unen a la secuencia y activada en las regiones promotoras de genes sensibles. En los hepatocitos humanos primarios, el IFN-alfa activa STAT1, STAT2, STAT3 y STAT5, seguido de la inducción de una amplia variedad de genes antivirales y proapoptóticos que pueden contribuir a la actividad antitumoral y antiviral de IFN-alfa en hígados humanos.

En contraste con IFN-alfa que activa STAT1, STAT2 y STAT3, en el caso de IFN de tipo II (IFN  $\gamma$ ), la unión al receptor conduce a la fosforilación exclusiva de STAT1 por Jak1 y Jak2, y esto es seguido por la homodimerización de STAT1 y la translocación nuclear del homodímero.

Las infecciones víricas representan un enorme problema de salud en todo el mundo. Entre los virus que causan infecciones crónicas, son importantes el causante de hepatitis B (HBV) y el causante de hepatitis C (HCV), como los factores etiológicos principales de hepatitis crónica vírica y cirrosis hepática, trastornos que afectan a más de 500 millones de personas en el mundo (alrededor de 300 millones afectados por HBV y 200 millones por HCV). El HBV causa infección crónica principalmente en casos de transmisión vertical e individuos inmunodeprimidos. La infección por HCV, por otro lado, es notable por la tendencia a desarrollar cronicidad en la mayor parte de los casos, indicando que este virus ha desarrollado mecanismos particularmente eficaces para evadir el sistema interferón. Los pacientes con infección crónica por HCV así como los pacientes con hepatitis crónica B fallan en la respuesta a la terapia con interferón. En la hepatitis crónica B, la respuesta antivírica sostenida ocurre en menos del 40% de los casos [1]. En el caso de hepatitis crónica C, aunque la mayoría de los pacientes infectados con genotipos HCV 2 ó 3, exhiben respuesta virológica sostenida (SVR) después de 24 o 48 semanas de terapia de combinación con IFN-alfa pegilado y ribavirina [2], sólo 50% de aquéllos infectados con genotipo 1 alcanzó SVR con este régimen de tratamiento [2]. Puesto que más del 80% de los pacientes infectados con HCV en el mundo occidental y Asia corresponden al genotipo 1, se necesitan urgentemente medios más eficaces para aumentar la eficacia antivírica de IFN-alfa. Los mecanismos subyacentes de la resistencia al IFN-alfa observados en HCV y otras enfermedades víricas crónicas son todavía pobremente comprendidos y hay una necesidad enorme de encontrar estrategias terapéuticas capaces de superar la resistencia a la terapia con IFN-alfa en estas enfermedades.

La respuesta de la célula infectada por el virus al interferón-alfa depende de varios factores determinantes, incluyendo aquéllos relacionados con el virus y aquéllos específicos relacionados con el huésped. Diversos productos génicos de HCV han demostrado modular la respuesta del huésped a la terapia con IFN e influenciar la gravedad de la enfermedad vírica, en particular hepática. Se ha divulgado que proteínas no-estructurales (NS5A) y proteínas estructurales (E2) de HCV interactúan con PKR, una de las moléculas clave implicadas en el desarrollo de un estado antiviral en respuesta al IFN [3, 4]. Esto podría bloquear la PKR dando como resultado una inhibición de la actividad de IFN en células infectadas por HCV. Por otro lado, varios estudios han demostrado que la señal de STAT1 inducida por IFN-alfa está afectada tanto en ratones transgénicos con HCV como en biopsias hepáticas de pacientes con HCV crónicos [5, 6].

## ES 2 302 402 B1

Se ha observado que en muestras hepáticas con HCV, y en células hepáticas portadoras de un replicón de HCV genómico (longitud completa), hay una disminución marcada en la cantidad de ARNm de IFNAR2 y de STAT3. Es relevante el hecho de haber encontrado que la activación de STAT1, STAT2 y STAT3 por IFN-alfa se bloqueó en células hepáticas que contenían un replicón de HCV de longitud completa, indicando así que la replicación de HCV puede bloquear la señalización de IFN-alfa en las células infectadas. Es también interesante el hecho de que en estas células no se ve afectada la activación de STAT1 cuando se incubaron con la molécula proinflamatoria IFN-gamma, indicando así que el bloqueo de la activación de STAT1 producido por HCV es específico para la cascada de señalización de IFN de tipo I, y que no afecta a la vía de señalización del IFN de tipo II.

Hay otras citoquinas que activan la vía de señalización de Jak-STAT, en particular, miembros de la familia de la IL-6, que comprende IL-6, IL-11, factor inhibidor de la leucemia (LIF), oncostatina (OSM), cardiotrofina-1 (CT-1), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y citoquina similar a la cardiotrofina (CLC) [7]. Estas citoquinas se unen a los complejos receptores de la membrana plasmática que comprenden la cadena receptora de transducción de señales común gp130 [7]. La transducción de señales implica la activación de los miembros de la familia de tirosín-quinasa Jak, conduciendo a la activación de los factores de transcripción STAT1 y STAT3. Estas citoquinas potencialmente activan STAT3 y en menor medida STAT1 a través de su subunidad receptora común gp130. Sin embargo, aunque se ha mostrado que IL-6 induce algunos efectos antivirales [8], la actividad antiviral de esta citoquina es mucho menor que la del interferón-alfa.

La presente invención se refiere al uso de una interleuquina de la familia de la IL-6, preferentemente, la cardiotrofina-1 (CT-1) u oncostatina M (OSM):

(1) para potenciar la actividad antiviral del interferón alfa (IFN-alfa);

(2) para superar la resistencia al interferón observada en pacientes con infección vírica crónica, que no responden a la terapia de IFN-alfa (solo o asociado con otros compuestos antivirales);

(3) para conseguir un tratamiento combinado de interleuquina de la familia IL-6, preferentemente CT-1 u OSM, más IFN-alfa como terapia antiviral mejorada en cualquier forma de infección vírica, y en particular en infección por virus de hepatitis C (HCV), en el que la combinación preferente de CT-1-IFN-alfa u OSM-IFN-alfa ha resultado ser especialmente potente en la inhibición de la replicación de HCV.

La presente invención ha conseguido los siguientes objetivos:

(1) mostrar que la combinación de interferón-alfa y una interleuquina de la familia de IL-6, y de manera preferente la CT-1 y la OSM, produce un efecto antiviral más potente que aquel inducido por una citoquina (IFN o citoquina de la familia IL-6) únicamente; y

(2) mostrar que el interferón-alfa asociado a una citoquina de la familia IL-6, en particular, la CT-1 o la oncostatina M, es capaz de superar el bloqueo de la cascada de señalización del interferón-alfa (y consecuentemente, la atenuación del efecto del interferón-alfa que se produce cuando el virus, preferentemente HCV, se replica en la célula infectada).

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere en primer lugar al uso de al menos una citoquina de la familia IL-6 -familia gp130 - o una secuencia de ADN que la codifica, en la preparación de una composición farmacéutica para la administración combinada con al menos un interferón-alfa o una secuencia de ADN que lo codifica, en el tratamiento de enfermedades virales.

Según la presente invención la citoquina de la familia IL-6 está seleccionada preferentemente del grupo formado por la IL-6, la cardiotrofina-1, la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia, la oncostatina M, factor neurotrófico ciliar, la citoquina semejante a la cardiotrofina, y combinaciones de ellas; y de modo más preferente aún, dicha citoquina es la cardiotrofina-1 o la oncostatina M.

Tal y como se utiliza en la presente invención, la citoquina de la "familia IL-6", por ejemplo CT-1 se refiere a:

- la forma nativa completa de dicha citoquina;

- cualquier fracción activa de dicha citoquina, es decir, cualquier secuencia polipeptídica parcial de dicha citoquina que mantenga los efectos fisiológicos de la citoquina completa reivindicados en la presente invención; y

- cualquier derivado polipeptídico de dicha citoquina, es decir, cualquier secuencia polipeptídica que tenga una homología con dicha citoquina nativa superior al 80% y que mantenga los efectos fisiológicos de la citoquina completa reivindicados en la presente invención.

## ES 2 302 402 B1

La citoquina de la familia IL6 (bien sea completa, una fracción activa o un derivado polipeptídico) puede proceder tanto de la forma nativa, como de cualquier forma de citoquina recombinante, a partir de cualquier forma polinucleotídica que codifica para la citoquina completa, la fracción activa o el derivado polipeptídico.

5 Por otra parte, según la presente invención, el interferón-alfa de la invención es cualquier tipo de interferón-alfa. En una realización particular dicho interferón-alfa está seleccionado entre el interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-5, interferón consenso, interferón-alfa purificado, interferón-alfa pegilado y combinaciones de los mismos; En otra realización particular el interferón-alfa está seleccionado entre interferón-alfa-2b pegilado, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-5 pegilado y combinaciones de los mismos.

10 El uso combinado de un interferón-alfa y de una citoquina de la familia de la interleuquina-6 está dirigido al tratamiento de una enfermedad preferentemente viral. Como ejemplo de enfermedades virales que pueden ser tratadas mediante el uso combinado del interferón y una citoquina de la familia interleuquina-6 se pueden citar, sin que el uso se limite a ellas, las enfermedades producidas por el virus de la encefalomiocarditis, hepatitis B y C, VIH, infecciones virales cutáneas (varicela, herpes zoster, sarampión), infecciones virales respiratorias, enfermedades virales del sistema nervioso central, enfermedades virales hepáticas, enfermedades virales de las glándulas salivares, mononucleosis infecciosas y verrugas genitales.

20 De manera preferida, la enfermedad viral es una hepatitis C.

Además, de acuerdo con la presente invención, la citoquina - o citoquinas - de la familia de IL-6 y el interferón-alfa pueden ser administrados separadamente estando presentes en composiciones farmacéuticas distintas; o pueden ser administrados conjuntamente, estando presentes en una misma composición farmacéutica.

25 Un objeto adicional de la presente invención es por lo tanto una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos una citoquina de la familia IL-6 - familia gp130 -, o una secuencia de ADN que la codifica, y una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos un interferón-alfa, o una secuencia de ADN que lo codifica.

30 En dicha composición farmacéutica que comprende al menos un interferón-alfa, o una secuencia de ADN que lo codifica, y al menos una citoquina de la familia de IL-6, o una secuencia de ADN que lo codifica, la citoquina de la familia IL-6 está seleccionada preferentemente entre la IL-6, la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, la citoquina semejante a la cardiotrofina y combinaciones de las mismas; y de manera más preferente aún, dicha citoquina de la familia IL-6 es cardiotrofina-1 o la oncostatina M.

35 En la composición farmacéutica de la invención, el interferón-alfa es cualquier tipo de interferón-alfa. En una realización preferida el interferón-alfa se ha seleccionado entre el interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-5, interferón consenso, interferón-alfa purificado, interferón-alfa pegilado y combinaciones de los mismos. En otra realización preferida adicional el interferón-alfa está seleccionado entre interferón-alfa-2b pegilado, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-5 pegilado y combinaciones de los mismos.

40 En una realización particular, la secuencia de ADN que codifica la citoquina de la familia IL-6 (bien sea completa, una fracción activa o un derivado polipeptídico) o el interferón-alfa está incorporada en un vector de expresión, por ejemplo, un plásmido o un vector viral, preferentemente operativamente unido a una secuencia de control que regula la expresión de la citoquina o el interferón-alfa. La construcción de dicho vector de expresión con la secuencia de ADN puede realizarse por métodos convencionales de tecnología recombinante recogidos en manuales como por ejemplo "Molecular Cloning: a Laboratory manual" de J. Sambrook, D.W. Russel Eds. 2001, 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York. Estas formas de realización de la composición farmacéutica resultan de interés para terapias mediante transferencia génica (terapia génica).

50 La composición farmacéutica de la invención puede comprender además, al menos un excipiente farmacéuticamente compatible con la citoquina de la familia IL-6, o con la secuencia de ADN que la codifica, y es farmacéuticamente compatible con el interferón-alfa o la secuencia de ADN que lo codifica.

55 Además, en la composición farmacéutica, la citoquina de la familia IL-6 - o la secuencia de ADN que la codifica - y el interferón-alfa - o la secuencia de ADN que lo codifica - pueden estar vehiculizados en sendos agentes vehiculizantes.

60 Son ejemplos válidos de la composición farmacéutica de la invención, sin que estos deban tomarse como una limitación de la misma, cualquier composición sólida (por ejemplo, comprimidos, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, etc.) para su administración por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo oral, nasal, parenteral, tópica, transdérmica, rectal, etc.

65 En una realización particular, dicha composición farmacéutica puede estar en una forma farmacéutica de administración por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubricantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. La composición farmacéutica también puede ser adaptada para su admi-

## ES 2 302 402 B1

nistración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dicha composición farmacéutica incluirá los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos, para estas y otras vías alternativas posibles, y de su preparación puede encontrarse por ejemplo en el libro “Tecnología farmacéutica”, de J. L. Vila Jato, 1997 Vols I y II, Ed. Síntesis, Madrid; o en “Handbook of pharmaceutical manufacturing formulations”, de S. K. Niazi, 2004 Vols I a VI, CRC Press, Boca Raton.

En una realización particular la composición farmacéutica es para administración parenteral, preferentemente por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

En una realización particular de la composición farmacéutica de la invención el interferón-alfa se encuentra en forma pegilada. Algunos ejemplos para la preparación de composiciones con formas pegiladas de interferón-alfa pueden encontrarse en US5.762.923 y US5.766.582. También es posible adquirir algunas de estas formas pegiladas comercialmente, como por ejemplo PEG-Intron (interferón-alfa-2b pegilado) de Schering Corporation (Kenilworth, N.J. EE.UU.) y PEGASYS(interferón-alfa-2a) de Hoffmann La Roche (Nutley, N. J., EE.UU.).

Para su aplicación en terapia, tanto la citoquina de familia IL-6 como el interferón-alfa se encontrarán preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tendrán un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los excipientes farmacéuticamente aceptables y no incluyendo material considerado tóxico a los niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para la citoquina de familia IL-6 y el interferón-alfa son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente, superiores al 70%, más preferiblemente, superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95%.

En general, la cantidad terapéuticamente efectiva de la citoquina de familia IL-6 y del interferón-alfa a administrar dependerán, entre otros factores, del individuo que vaya a ser tratado, de la severidad de la enfermedad que padezca dicho individuo, de la forma de administración elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y éste debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, se pueden administrar citoquina de familia IL-6 y el interferón-alfa, una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día.

A título ilustrativo, y sin que esto suponga una limitación del ámbito de protección, en una realización particular en la que se combinan cardiotrofina-1 e interferón-alfa-2a (ó 2b), la cantidad típica total diaria de cardiotrofina-1 está comprendida entre 1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 10 mg/kg de peso corporal; y la cantidad típica total diaria de interferón-alfa-2a está comprendida entre 1,5 y 10 MUI diarias o entre 40 y 300 microgramos semanales de interferón-alfa pegilado. Normalmente el nivel de dosificación será más alto en las primeras semanas de tratamiento, reduciéndose la dosis en etapas posteriores. Asimismo el régimen de administración puede ser diario, de 3 veces por semana, o también semanal. Por otra parte, la cardiotrofina-1 y el interferón-alfa pueden ser administrados según diferentes regímenes de administración (por ejemplo, distinta vía de administración o distinta frecuencia).

La presente invención tiene como objeto adicional un kit farmacéutico para el tratamiento de una enfermedad viral que comprende al menos:

- un primer componente que comprende al menos una citoquina de la familia IL-6 -familia gp130- (bien sea completa, una fracción activa o un derivado polipeptídico, tal como se han definido anteriormente) o una secuencia de ADN que codifica dicha citoquina; y

- un segundo componente que comprende al menos un interferón-alfa o una secuencia de ADN que codifica dicho interferón-alfa.

El kit de acuerdo con la invención comprende preferentemente una citoquina de la familia IL-6 seleccionada entre la IL-6, la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, la citoquina semejante a la cardiotrofina y combinaciones de las mismas, y de manera más preferente aún la citoquina de la familia IL-6 es cardiotrofina-1 u oncostatina M.

El kit de acuerdo con la invención comprende un interferón-alfa de cualquier tipo, preferentemente uno seleccionado entre el interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-5, interferón consenso, interferón-alfa purificado, interferón-alfa pegilado y combinaciones de los mismos. En otra realización preferente, el interferón-alfa está seleccionado entre interferón-alfa-2b pegilado, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-5 pegilado y combinaciones de los mismos.

En una realización particular la secuencia de ADN que codifica la citoquina de la familia IL-6 (bien sea completa, una fracción activa o un derivado polipeptídico) o el interferón-alfa del kit está incorporado en un vector de expresión.

En el kit de la presente invención, el primer componente y el segundo componente pueden comprender además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y compatible con la citoquina de la familia IL-6 - o una secuencia de ADN que la codifica - y con el interferón-alfa- o una secuencia de ADN que lo codifica -.

## ES 2 302 402 B1

Según la presente invención el kit definido anteriormente puede comprender el primer y el segundo componente en composiciones farmacéuticas separadas; o bien el primer y el segundo componente pueden estar presentes en el kit en una misma composición farmacéutica.

5 Dicho kit puede comprender además un tercer componente que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente compatibles con la citoquina de la familia IL-6 - o una secuencia de ADN que la codifica - y con el interferón-alfa - o una secuencia de ADN que lo codifica -.

10 Dicho tercer componente puede comprender además uno o más agentes vehiculizantes farmacéuticamente compatibles con la citoquina de la familia IL-6 - o una secuencia de ADN que la codifica - y con el interferón-alfa - o una secuencia de ADN que lo codifica.

15 La presente invención tiene como objeto adicional un método para el tratamiento de una enfermedad viral que comprende administrar de manera combinada una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una citoquina de la familia IL-6 - familia gp130 - (bien sea completa, una fracción activa o un derivado polipeptídico, tal como se han definido anteriormente), o una secuencia de ADN que la codifica, y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un interferón-alfa, o una secuencia de ADN que lo codifica.

20 En una realización particular la secuencia de ADN que codifica la citoquina de la familia IL-6 o el interferón-alfa del método está incorporado en un vector de expresión.

25 En el método definido anteriormente, la enfermedad viral puede ser producida por el virus de la encefalomiocarditis, hepatitis B y C, VIH, infecciones virales cutáneas (varicela, herpes zoster, sarampión), infecciones virales respiratorias, enfermedades virales del sistema nervioso central, enfermedades virales hepáticas, enfermedades virales de las glándulas salivares, mononucleosis infecciosas y verrugas genitales.

Según una realización preferida del método de la invención, la enfermedad viral es una hepatitis C.

30 De acuerdo con el método de la invención, la citoquina de la familia IL-6 está preferentemente seleccionada entre la IL-6, la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, la citoquina semejante a la cardiotrofina y combinaciones de ellas, de manera más preferente aún, la citoquina de la familia IL-6 es la cardiotrofina-1 u oncostatina M.

35 En el método definido según la invención, el interferón-alfa es cualquier tipo de interferón-alfa. En una realización preferente está seleccionado entre el interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-5, interferón consenso, interferón-alfa purificado, interferón-alfa pegilado y combinaciones de los mismos; en otra realización preferida adicional el interferón-alfa está seleccionado entre interferón-alfa-2b pegilado, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-5 pegilado y combinaciones de los mismos.

40 Además según el método de la invención, éste puede comprender la administración combinada y simultánea de la citoquina de la familia de la interleuquina, preferentemente, cardiotrofina-1, e interferón-alfa.

45 En el método presente la citoquina de la familia IL-6 (bien sea completa, una fracción activa o un derivado polipeptídico) y el interferón-alfa pueden estar presentes en una misma composición farmacéutica que se administra al paciente; o bien la citoquina de la familia IL-6 y el interferón-alfa se pueden administrar en composiciones farmacéuticas separadas.

50 La presente invención muestra que cuando se estimulan las células hepáticas que comprenden un replicón completo de HCV con interferón-alfa y una interleuquina de la familia de IL-6, en particular, la cardiotrofina-1:

(1) se supera el efecto inhibitorio de HCV sobre la fosforilación de STAT3, que se produce cuando las células son incubadas con interferón-alfa solo o con una citoquina de la familia IL-6 (por ejemplo CT-1) sola.

55 (2) se genera una inducción más elevada de genes sensibles al interferón (ISGs) tales como 2'-5'-oligoadenilato sintasa (2'-5'-OAS) y niveles más elevados de STAT1 y STAT3 que cuando las células son incubadas con citoquina únicamente, y

(3) se inhibe la replicación del virus más eficazmente que cuando se usa la citoquina únicamente.

### 60 Breve descripción de las figuras

65 La figura 1 muestra un análisis de la fosforilación de STAT1, STAT2 y STAT3. Células Huh7 (Huh7) y células Huh7 que contienen un replicón genómico completo de HCV (Core-3') fueron tratadas durante 15, 60 y 120 minutos con 50 UI/ml de IFN-alfa-2 (IFN $\alpha$ ) o con 20 ng/ml de cardiotrofina-1 (CT1), o con una combinación de IFN-alfa-2 y CT-1, y se analizó la cantidad de STAT1, STAT2 y STAT3 fosforilados presentes en los extractos celulares mediante Western-blot.

## ES 2 302 402 B1

La figura 2 muestra un análisis cuantitativo de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real de STAT1, STAT3 y 2'-5'OAS, presente en células Huh7 que contienen un replicón completo de HCV, tratadas durante 3 días con 5 ó 50 UI/ml de IFN-alfa-2 y 20 ng/ml de CT-1. Control: control no tratado.

5 La figura 3 muestra un análisis cuantitativo, mediante RT-PCR en tiempo real, de ARN de HCV presente en células Huh7 que contienen un replicón completo de HCV, tratadas durante 3 días con 5 ó 50 UI/ml de IFN-alfa-2 y 20 ng/ml de CT-1.

10 La figura 4 muestra el porcentaje de células Huh7 protegidas frente a la infección con el virus de la encefalomiocarditis. Células Huh7 fueron pretratadas durante 24 horas con 5 ng/ml o 50 ng/ml de CT-1 y diferentes cantidades de IFN-alfa-2, y fueron infectadas con  $10^5$  UFP del virus de encefalomiocarditis (EMCV), y después de 24 horas, las células fueron teñidas con colorante cristal violeta para medir la cantidad de células viables.

15 La figura 5A muestra un análisis cuantitativo, mediante RT-PCR en tiempo real, de ARN de HCV presente en células Huh7 que contienen un replicón completo de HCV, tratadas durante 3 días con 5 ó 50 UI/ml de IFN-alfa-2 ó con 20 ng/ml de diferentes citoquinas de la familia IL-6. Las figuras 5 B y 5 C muestran un análisis cuantitativo, mediante RT-PCR en tiempo real, de ARN de HCV presente en células Huh7 que contienen un replicón completo de HCV, tratadas durante 3 días con 50 UI/ml de IFN-alfa-2 y 20 ng/ml de oncostatina M (figura 5B), ó 50 UI/ml de IFN-alfa-2 y 20 ng/ml de Interleuquina 6 (Figura 5C).

### 20 Modos de realización de la invención

#### Experimento 1

25 *Estudio del efecto de la combinación de IFN-alfa-2 y CT-1 sobre la cascada de señalización en células que mantienen la replicación de HCV (figura 1)*

30 En células Huh7 (una línea celular de hepatoma) no transfectadas la adición de 50 UI/ml de IFN-alfa-2 (interferón-alfa-2) indujo fosforilación de STAT1, STAT2 y STAT3 con activación máxima de STAT1 y STAT2 a 1 hora y 2 horas y de STAT3 a 1 hora (ver figura 1A). Sin embargo en células Huh7 transfectadas con un replicón HCV de longitud completa, se observó que había una marcada inhibición en la fosforilación de STAT1, STAT2 y STAT3 después de la incubación con IFN-alfa-2. Por lo tanto, se produjo una ausencia completa de STAT3 y STAT1 activadas y se produjo una inhibición marcada de la activación de STAT2 (ver figura 1A).

35 Por otro lado, en células Huh7 no transfectadas, se encontró que la adición de 20 ng/ml de CT-1 dio como resultado la activación tanto de STAT3 como de STAT1 (más intensamente la de STAT3), con valores máximos a los 15 minutos y 1 hora, y una disminución sustancial a las 2 horas (figura 1B). Como se esperaba, CT-1 no indujo ninguna activación de STAT2. En células Huh7 transfectadas con un replicón completo de HCV, la activación de STAT3 por CT-1 resultó marcadamente disminuida, mientras que la fosforilación de STAT1 se vio sólo ligeramente afectada (figura 40 1B).

45 Cuando se incubaron células Huh7 no transfectadas con una mezcla de 50 UI/ml de IFN-alfa-2 y 20 ng/ml de CT-1, se detectó una fosforilación más intensa y duradera de STAT3 y STAT1, que cuando las células se incubaron con cada una de las citoquinas solas. La activación de STAT2 fue similar a la encontrada con IFN-alfa-2 solo. Es importante el hecho de que cuando las células Huh7 transfectadas con un replicón completo de HCV se incubaron con la mezcla IFN-alfa-2 (50 UI/ml) más CT-1 (20 ng/ml) se encontró que la fosforilación de STAT3 se produjo sin ningún daño, siendo la activación de STAT3 no sólo más intensa, sino también más duradera que cuando las células no transfectadas se incubaron con IFN-alfa-2 solo (figura 3C). Este hecho es notable, puesto que, como se ha mencionado, (y se muestra en la figura 1A y 1B) la replicación de HCV en células Huh7 reduce seriamente la 50 activación de STAT3, tanto por IFN-alfa-2 como por CT-1 por separado, y por ello, es sorprendente que este bloqueo desaparezca por incubación de las células con las dos citoquinas juntas, abriendo así una nueva perspectiva para una estrategia prometedora en el tratamiento de las enfermedades virales. Se debe de notar también que cuando se combina IFN-alfa-2 y CT-1 para tratar células con replicación de HCV, no sólo se produce una activación de STAT3 potente y sostenida, sino que también se produce una activación de STAT1 de manera similar a aquélla encontrada cuando se 55 incuban células no transfectadas con CT-1 sola y más intensamente que cuando células no transfectadas se incuban con IFN-alfa-2 solo (comparar figura 1A y 1B). Es importante notar que IFN-alfa-2 fue incapaz de activar STAT1 en células con replicación sostenida de HCV, mientras que la combinación de CT-1 más IFN-alfa-2 fue capaz de activar de manera muy eficaz este importante factor antiviral en células con replicación de HCV. Esto muestra claramente que hay una mejora en la actividad antiviral combinando IFN-alfa-2 y CT-1, permitiendo la fosforilación de STAT2, 60 aunque a niveles claramente inferiores que cuando se usan células sin replicación de HCV (ver figura 1C).

65 En conclusión, cuando las células con replicación sostenida de HCV fueron tratadas con IFN-alfa-2 de modo aislado no hubo activación de STAT1 y STAT3, y únicamente se observaron bajos niveles de STAT2. La falta de STAT1 y STAT3 activados - dos inductores importantes del estado antiviral de la célula podría prevenir la formación de heterodímeros STAT1-STAT2, de heterodímeros STAT1-STAT3 y de homodímeros STAT1 y STAT3, colapsando así la defensa antiviral de la célula. El uso de CT-1 en combinación con IFN-alfa-2 permite la formación de altos niveles de STAT1 y STAT3 activados, restaurando así el mecanismo de resistencia viral de la célula.

## ES 2 302 402 B1

En los experimentos que se muestran en la figura 1, se puede ver que la infección por HCV determina no sólo una activación defectuosa de STAT1, sino también una reducción de los niveles de las proteínas STAT3 y STAT2. Los estudios que se representan en la figura 1 muestran los efectos a corto plazo de la incubación bien con IFN-alfa-2 o con CT-1, o con la combinación de los dos. En los experimentos que se describen a continuación se muestra que con la incubación durante 72 horas, se puede observar que el tratamiento combinado de CT-1 e IFN-alfa-2 dio como resultado una expresión aumentada de STAT3, contrarrestando así el efecto de HCV en las células infectadas (ver figura 2).

### Método experimental 1

*Establecimiento de líneas celulares Huh7 portadoras del replicón del HCV de longitud completa.* Se establecieron células Huh7 que expresaban el replicón del HCV de longitud completa como se ha descrito [9]. Resumiendo, se linealizaron pI<sub>389</sub>/Core-3'/5.1 con ScaI (New England Biolabs, USA) y se utilizaron como plantillas para la síntesis de ARN usando la ARN polimerasa T7 (Promega, USA). Se usaron 20 µg de ARN sintetizado para electroporar 10<sup>7</sup> células Huh7 y, a las 24 horas, se añadieron 500 µg/ml de G418 (Gibco, USA). Dos veces por semana, se reemplazó el medio de cultivo suplementado con G418 y, a las 4 semanas de la transfección, se recogieron las colonias resistentes a G418 mezcladas y se usaron para posterior análisis.

*Análisis por transferencia Western.* Se sembraron células Huh7 que expresaban o no expresaban el replicón del HCV de longitud completa a 200.000/pocillo en placas de 6 pocillos en D-MEM (Gibco) con un 10% de FCS (Gibco). Se añadieron 50 UI/ml de IFN-alfa-2 (Intron A, Schering-Plough), ó 20 ng/ml de CT-1 (R&D Systems, UK), o una combinación de IFN-alfa-2 (50 UI/ml) más CT-1 (20 ng/ml) durante diferentes períodos de tiempo: 15 minutos, 1 hora y 2 horas. Después, se lisaron las células Huh7 en tampón de lisis (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 2,5%, 2-mercaptoetanol 0,7 M y azul de bromofenol 0,02%). Se resolvieron las muestras en geles de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories, CA) al 7,5% en condiciones reductoras. Después de la electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories) y se tiñeron con solución roja de Ponceau (Sigma-Aldrich, Alemania), para verificar que había una carga igual de proteínas. Se incubaron las membranas en TBS-T (Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), NaCl 200 mM y 0,1% de Tween-20) con leche deshidratada al 5%. Se detectaron las proteínas por incubación con el anticuerpo primario específico en TBS-T durante 1 hora. Después se lavaron las membranas en TBS-T y se añadió anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 1 hora. Se sometieron las membranas a lavados extensos en TBS-T y se visualizaron las bandas proteicas específicas usando el sistema de detección de quimioluminiscencia "Western Lightning chemiluminescence reagent plus" (Perkin Elmer, USA), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se autorradiografiaron las membranas y se cuantificaron las bandas por análisis densitométrico realizado mediante el programa Molecular Analyst/PC (Bio-Rad Laboratories).

*Anticuerpos.* Se compraron los anticuerpos anti-fosfo-STAT1<sup>tyr701</sup> y anti-fosfo-STAT3<sup>tyr705</sup> y el anticuerpo IgG anti-conejo unido a HRP, a Cell Signaling Technology (USA). Se obtuvieron los anticuerpos anti-STAT3, anti-fosfo-STAT1<sup>ser727</sup>, anti-STAT2 y anti-fosfo-STAT2<sup>tyr689</sup> de Upstate Biotechnology (USA). El anticuerpo anti-STAT1 era de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo anti-actina era de Sigma-Aldrich (Alemania).

Para ver si la combinación de CT-1 con IFN-alfa-2 da lugar a un estado antivírico más fuerte de la célula, realizamos experimentos adicionales dirigidos a: a) la evaluación de si la terapia de combinación de IFN-alfa-2 más CT-1 puede aumentar la expresión de genes sensibles al interferón más intensamente que cualquiera de las citoquinas sola; b) la determinación de si la terapia de combinación de IFN-alfa-2 más CT-1 podría ser más potente en la inhibición de la replicación del HCV que cada citoquina por aislado, y c) la evaluación de si la terapia de combinación de IFN-alfa-2 más CT-1 podría ser más eficiente a la hora de defender las células frente a los efectos citopáticos de un virus no relacionado con el HCV.

### Experimento 2

*Evaluación del efecto de la terapia de combinación de IFN-alfa-2 más CT-1 sobre la inducción de genes sensibles al interferón (ISGs) (Figura 2)*

Se estudió la expresión de los ISGs, 2'-5' OAS, STAT1 y STAT3, en células Huh7 portadoras del replicón del HCV tras incubar durante 72 horas con IFN-alfa-2 (5 ó 50 UI/ml) o CT-1 (20 ng/ml) o ambas citoquinas conjuntamente (véanse las Fig. 2A, 2B y 2C). Observamos que, mientras CT-1 sola no era capaz de aumentar la expresión de estos ISGs, la adición de CT-1 a dosis bajas o altas de IFN-alfa-2 daba lugar a un marcado aumento de la expresión de los ISGs, lo que indica que CT-1 puede aumentar marcadamente la capacidad de IFN-alfa-2 para regular de forma creciente los genes antivíricos en células que soportan la replicación vírica. Aunque los tres ISGs aquí analizados tienen efectos antivíricos significativos, el aumento de la expresión de STAT3 combinando CT-1 y IFN-alfa-2 es de particular relevancia, ya que este factor no sólo posee propiedades antivíricas, sino que también exhibe una potente actividad citoprotectora y antiinflamatoria.

### Método experimental 2

*Análisis de la expresión del ARNm de los ISGs por RT-PCR en tiempo real.* Se sembraron células Huh7 que expresaban el replicón del HCV de longitud completa a 100.000/pocillo en placas de 6 pocillos en D-MEM (Gibco), con un 10% de FCS (Gibco). Se añadieron 50 ó 5 UI/ml de IFN-alfa-2 solo o en combinación con 20 ng/ml de CT-



## ES 2 302 402 B1

1. Se mantuvo el cultivo celular durante tres días. Se reemplazó a diario el medio de cultivo suplementado con las citoquinas anteriores. Se obtuvo el ARN total siguiendo el protocolo de "Ultraspec RNA isolation system" (Biotech, USA), que se basa en el método descrito por Chomczynski y Sacchi [10]. Se trataron dos microgramos de ARN total con ADNasa (Gibco-BRL, UK) antes de la transcripción inversa con M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL) en presencia de RNaseOUT (Gibco-BRL). Se midió la expresión de los STAT, del 2'-5' OAS y de la  $\beta$ -actina por PCR en tiempo real usando un ICycler y la IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, CA). Se usaron alícuotas de 2  $\mu$ l del pool de ADNc para cada PCR, que contenía cebadores sentido y antisentido específicos para cada gen (Tabla 1) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Para determinar la especificidad de los productos de PCR obtenidos, se analizó la temperatura de disociación de los mismos. Se normalizaron los resultados según la cuantificación de  $\beta$ -actina en la misma muestra. Se expresó la cantidad de cada transcrito por la fórmula  $2^{ct(\text{actina})-ct(\text{gen})}$ , siendo ct el punto al cual la fluorescencia sube apreciablemente por encima de la fluorescencia de fondo.

TABLA 1

*Cebadores usados en este estudio*

Gen	Cebador sentido (5' -3')	Cebador antisentido (5' -3')
2' -5' OAS	SEQ. ID. NO: 1 TTAAGAGGCAACTCCGATGG	SEQ. ID. NO: 2 AGCAGACTGCAAACCTCACCA
STAT1	SEQ. ID. NO: 3 GCTATTTCACAACCACTCATTCA	SEQ. ID. NO: 4 ACAAGATACAGCCACATAGACA
STAT3 $\alpha$	SEQ. ID. NO: 5 GTCCGTGGAACCATACACAA	SEQ. ID. NO: 6 CAATGGTATTGCTGCAGGTG
$\beta$ -actina	SEQ. ID. NO: 7 AGCCTCGCCTTTGCCGA	SEQ. ID. NO: 8 CTGGTGCCTGGGGCG
HCV	SEQ. ID. NO: 9 CCTGTGAGGAACTACTGTCT	SEQ. ID. NO: 10 CTATCAGGCAGTACCACAAG

### Experimento 3

*Estudio de los efectos de la combinación de IFN-alfa-2 más CT-1, sobre la replicación de HCV en células Huh7 transfectadas con el replicón del HCV de longitud completa (Figura 3)*

Debido a la más fuerte inducción de los ISGs observada al combinar IFN-alfa-2 más CT-1, se deseaba analizar si esta combinación era superior al IFN-alfa-2 solo, o a la CT-1 sola en la reducción de la carga vírica en células con el replicón del HCV de longitud completa. Así, se incubaron células Huh7 portadoras del replicón del HCV con IFN-alfa-2 (5 ó 50 UI/ml) más o menos CT-1 (20 ng/ml) o con CT-1 sola y se midió la cantidad de ARN HCV después de 72 horas de cultivo (Fig. 3). En la Figura 3, puede verse que la CT-1 por sí sola tiene un modesto efecto antivírico, que es similar al observado con el IFN-alfa-2 a dosis bajas (5 UI/ml). Sin embargo, la CT-1 potenció fuertemente el efecto antivírico del IFN-alfa-2 cuando se usó esta citoquina a dosis baja (5 UI/ml) o alta (50 UI/ml). Así, la carga vírica cayó de aproximadamente 300 unidades arbitrarias con dosis baja de IFN-alfa-2 solo a 30 con la combinación de dosis baja de IFN-alfa-2 más CT-1. Habría que hacer notar (véase la Fig. 3) que esta carga vírica era incluso inferior a la obtenida con la dosis alta de IFN-alfa-2 solo. En otras palabras, la terapia de combinación aumenta en un factor de 10 ó más, el efecto antivírico del IFN-alfa-2. Es interesante el hecho de que la asociación de 50 UI/ml de IFN-alfa-2 y CT-1 redujera la carga vírica a menos de 1, mientras que la dosis alta de IFN-alfa-2 solo dio lugar a una carga vírica superior a 30. Estos datos muestran claramente que el efecto antivírico del IFN-alfa-2 aumenta marcadamente por su asociación a CT-1.

### Método experimental 3

*Análisis del ARN HCV por PCR cuantitativa en tiempo real.* Se sembraron células Huh7 que expresaban el replicón del HCV de longitud completa a 100.000/pocillo en placas de 6 pocillos en D-MEM con un 10% de FCS. Se añadieron 50 ó 5 UI/ml de IFN-alfa-2 solo o en combinación con 20 ng/ml de CT-1. Se mantuvo el cultivo celular durante tres días. Se reemplazó el medio de cultivo suplementado con las anteriores citoquinas a diario.

## ES 2 302 402 B1

Se obtuvo el ARN total de células Huh7 transfectadas con el replicón del HCV de longitud completa siguiendo el protocolo de "Ultraspec RNA isolation system" (Biotech, USA), que se basa en el método descrito por Chomczynski y Sacchi [10]. Se trataron dos microgramos de ARN total con ADNasa (Gibco-BRL) antes de la transcripción inversa con M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco-BRL) en presencia de RNaseOUT (Gibco-BRL). Se midió la expresión del ARN HCV y del ARNm de la  $\beta$ -actina por PCR cuantitativa en tiempo real usando un ICycler y la IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Se usaron alícuotas de 2  $\mu$ l del pool de ADNc para cada PCR, que contenía cebadores sentido y antisentido específicos de la región no traducida 5' del HCV o para el gen de la  $\beta$ -actina (Tabla 1) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Para determinar la especificidad de los productos de PCR, se analizó la temperatura de disociación de los mismos. Se normalizaron los resultados según la cuantificación de  $\beta$ -actina en la misma muestra. Se expresó la cantidad de ARN HCV por la fórmula  $2^{ct(\text{actina})-ct(\text{HCV})}$ , siendo ct el punto al cual la fluorescencia sube apreciablemente por encima de la fluorescencia de fondo.

### Experimento 4

*Estudio de los efectos de la combinación de IFN-alfa-2 más CT-1 en la defensa contra los efectos citopáticos del virus de la encefalomiocarditis (EMCV) (Figura 4)*

Con objeto de determinar si el efecto sinérgico de la terapia de combinación se produce también en otras infecciones víricas diferentes del HCV, hemos analizado la protección obtenida mediante este tratamiento contra el efecto citopático del virus de la encefalomiocarditis. Se incubaron células Huh7 con dosis decrecientes de IFN-alfa-2 de 250 a 1 UI/ml en presencia o ausencia de una: dosis baja (5 ng/ml) o alta (50 ng/ml) de CT-1 y se infectaron 24 horas después con EMCV. Observamos que la CT-1 por sí sola (a dosis baja o alta) tenía poco efecto citoprotector sobre células infectadas por EMCV, ya que la adición de esta citoquina a dosis muy bajas de IFN-alfa-2 no mejoraba la viabilidad celular. Sin embargo, la CT-1, tanto a dosis baja como alta, aumentaba marcadamente la protección inducida por el IFN-alfa-2 contra el efecto citopático del EMCV. Se vio esta sinergia al usar dosis de IFN-alfa-2 de entre 250 y 28 UI/ml, siendo la sinergia más pronunciada a una dosis de IFN-alfa-2 de 83 y de 28 UI/ml. Estos datos muestran que la sinergia antivírica del IFN-alfa-2 y de la CT-1 no se restringe al HCV, sino que se aplica a un amplio espectro de enfermedades víricas.

### Método experimental 4

*Ensayo citoprotector de IFN-alfa-2 y CT-1 frente al EMCV en células Huh7.* Se determinó la actividad citoprotectora de IFN-alfa-2 y CT-1 midiendo la capacidad de estas citoquinas para proteger células Huh7 contra el efecto citopático del virus de la encefalomiocarditis. Se realizó el ensayo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Primeramente, se sembraron  $2 \times 10^4$  células Huh7 por pocillo en 150  $\mu$ l de medio que contenía diluciones seriadas de IFN-alfa-2 solo (de 250 a 1 UI/ml) o estas diluciones seriadas de IFN-alfa-2 más 50 ó 5 ng/ml de CT-1 y se incubaron durante 24 horas. Se añadieron  $10^5$  UFP de virus EMC por pocillo y se midió el efecto citopático a las 24 horas como sigue: tras eliminar el medio, se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se tiñeron con solución colorante de cristal violeta (0,5% en metanol-agua 1:4 v/v). Se leyó la densidad óptica a 540 nm. Se expresan los resultados como porcentaje de células protegidas contra el efecto citopático del EMCV.

### Experimento 5

*Estudio de los efectos de diversas citoquinas de la familia de la interleuquina 6 sobre la replicación de HCV en células Huh7 transfectadas con el replicón del HCV de longitud completa (Figura 5)*

Quisimos estudiar si otras citoquinas de la familia de la interleuquina 6, además de la CT-1, poseían efecto frente a la replicación del virus C y si la combinación de IFN-alfa-2 más alguna de ellas también reducía la carga vírica de HCV con mayor intensidad que la administración de IFN-alfa-2 solo. Así, se incubaron células Huh7 portadoras del replicón del HCV con 20 ng/ml de diversas citoquinas de la familia de interleuquina 6 como son IL-6, IL-11, OSM y LIF. Además, se cultivaron células Huh7 portadoras del replicón del HCV con 50 UI/ml de IFN-alfa-2 más o menos OSM ó IL-6 (20 ng/ml) y se midió la cantidad de ARN HCV después de 72 horas de cultivo (Fig. 5). En la Figura 5A, puede verse que todas las citoquinas de la familia de IL-6 testadas (CT-1, IL-6, IL-11, OSM y LIF) tienen un modesto efecto antivírico por sí solas.

Por otra parte, también se observó que la combinación de OSM ó IL-6 (20 ng/ml) con IFN-alfa-2 (50 UI/ml) potenciaba el efecto antivírico del IFN-alfa-2 (Figuras 5B y 5C).

Estos datos muestran que el efecto antivírico del IFN-alfa-2 aumenta por su asociación con otras citoquinas de la familia de IL6, además de CT-1.

### Método experimental 5

*Análisis del ARN HCV por PCR cuantitativa en tiempo real.* Se sembraron células Huh7 que expresaban el replicón del HCV de longitud completa a 100.000/pocillo en placas de 6 pocillos en D-MEM con un 10% de FCS. Se añadieron 50 ó 5 UI/ml de IFN-alfa-2 solo o 20 ng/ml de CT ó IL6 (R&D Systems, UK) ó IL11 (R&D Systems, UK), ó OSM (R&D Systems, UK) ó LIF (Chemicon International, USA). Por otro lado, se añadió 50 UI/ml de IFN-alfa-2 solo ó en

## ES 2 302 402 B1

combinación con 20 ng/ml de OSM ó IL-6. Se mantuvo el cultivo celular durante tres días. Se reemplazó el medio de cultivo suplementado con las anteriores citoquinas a diario.

5 Se obtuvo el ARN total de células Huh7 transfectadas con el replicón del HCV de longitud completa siguiendo el protocolo de "Ultraspec RNA isolation system" (Biotech, USA), que se basa en el método descrito por Chomczynski y Sacchi [10]. Se trataron dos microgramos de ARN total con ADNasa (Gibco-BRL) antes de la transcripción inversa con M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco-BRL) en presencia de RNaseOUT (Gibco-BRL). Se midió la expresión del ARN HCV y del ARNm de la  $\beta$ -actina por PCR cuantitativa en tiempo real usando un ICycler y la IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Se usaron alícuotas de 2  $\mu$ l del pool de ADNc para cada PCR, que contenía  
10 cebadores sentido y antisentido específicos de la región no traducida 5' del HCV o para el gen de la  $\beta$ -actina (Tabla 1) en un volumen final de 20  $\mu$ l. Para determinar la especificidad de los productos de PCR, se analizó la temperatura de disociación de los mismos. Se normalizaron los resultados según la cuantificación de  $\beta$ -actina en la misma muestra. Se expresó la cantidad de ARN HCV por la fórmula  $2^{ct(\text{actina})-ct(\text{HCV})}$ , siendo ct el punto al cual la fluorescencia sube apreciablemente por encima de la fluorescencia de fondo.

### 15 Referencias

1. **Hoofnagle J H, Peters M, Mullen K D, Jones D B, Rustgi V, Di Bisceglie A, Hallahan C, Park Y, Meschievitz C, Jones E A.** Randomized, controlled trial of recombinant human alpha-interferon in patients with chronic hepatitis  
20 B. *Gastroenterology* 1988;95:1318-1325.

2. **Manns M P, McHutchison J G, Gordon S C, Rustgi V K, Shiffman M, Reindollar R, Goodman Z D, Koury K, Ling M, Albrecht J K.** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for  
25 initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001;358:958-965.

3. **Gale M J, Jr., Korth M J, Tang N M, Tan S L, Hopkins D A, Dever T E, Polyak S J, Gretch D R, Katze M G.** Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by  
the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997;230:217-227.

4. **Taylor D R, Shi S T, Romano P R, Barber G N, Lai M M.** Inhibition of the interferon-inducible protein kinase  
30 PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110.

5. **Blindenbacher A, Duong F H, Hunziker L, Stutvoet S T, Wang X, Terracciano L, Moradpour D, Blum H E, Alonzi T, Tripodi M, La Monica N, Heim M H.** Expression of hepatitis c virus proteins inhibits interferon alpha  
35 signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology* 2003;124:1465-1475.

6. **Duong F H, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim M H.** Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A. *Gastroenterology* 2004;126:263-277.

40 7. **Heinrich P C, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L.** Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334:297-314.

8. **Zhu H, Shang X, Terada N, Liu C.** STAT3 induces anti-hepatitis C viral activity in liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:518-528.

45 9. **Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R.** Persistent and, transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002;76:4008-4021.

50 10. **Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de al menos una citoquina de la familia IL-6 - familia gp130 - o una secuencia de ADN que la codifica, en la preparación de una composición farmacéutica para la administración combinada con al menos un interferón-alfa o una secuencia de ADN que lo codifica, en el tratamiento de enfermedades virales.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la citoquina de la familia IL-6 se ha seleccionado entre la IL-6, la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, la citoquina semejante a la cardiotrofina, y combinaciones de ellas.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la citoquina es la cardiotrofina-1 o la oncostatina M.
- 15 4. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el interferón-alfa se ha seleccionado entre el interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-5, interferón consenso, interferón-alfa purificado, interferón-alfa pegilado y combinaciones de los mismos.
- 20 5. Uso según una de las reivindicaciones 1 ó 4, **caracterizado** porque el interferón-alfa está seleccionado entre interferón-alfa-2b pegilado, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-5 pegilado y combinaciones de los mismos.
- 20 6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la citoquina de la familia IL-6 está seleccionada entre la proteína nativa completa, una secuencia polipeptídica parcial de dicha citoquina que mantiene los efectos fisiológicos de la citoquina completa y una secuencia polipeptídica que tenga una homología con dicha citoquina nativa superior al 80% y que mantenga los efectos fisiológicos de la citoquina completa.
- 25 7. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la enfermedad viral es una hepatitis C.
- 30 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la citoquina de la familia IL-6 y el interferón-alfa son administrados separadamente en composiciones farmacéuticas distintas.
- 30 9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la citoquina de la familia IL-6 y el interferón-alfa son administrados conjuntamente en una misma composición farmacéutica.
- 35 10. Una composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos una citoquina de la familia IL-6 - familia gp130 -, o una secuencia de ADN que la codifica, y una cantidad farmacéuticamente aceptable de al menos un interferón-alfa, o una secuencia de ADN que lo codifica.
- 40 11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, **caracterizada** porque la citoquina de la familia IL-6 se ha seleccionado entre la IL-6, la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, la citoquina semejante a la cardiotrofina y combinaciones de las mismas.
- 45 12. Una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 10 ó 11, **caracterizada** porque la citoquina de la familia IL-6 es cardiotrofina-1 u oncostatina M.
- 45 13. Una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizada** porque la citoquina de la familia IL-6 está seleccionada entre la proteína nativa completa, una secuencia polipeptídica parcial de dicha citoquina que mantiene los efectos fisiológicos de la citoquina completa y una secuencia polipeptídica que tenga una homología con dicha citoquina nativa superior al 80% y que mantenga los efectos fisiológicos de la citoquina completa.
- 50 14. Una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizada** porque el interferón-alfa se ha seleccionado entre el interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-5, interferón consenso, interferón-alfa purificado, interferón-alfa pegilado y combinaciones de los mismos.
- 55 15. Una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizada** porque el interferón-alfa está seleccionado entre interferón-alfa-2b pegilado, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-5 pegilado y combinaciones de los mismos.
- 60 16. Una composición farmacéutica según una de las reivindicaciones 10 a 15, **caracterizada** porque además comprende al menos un excipiente farmacéuticamente compatible con la citoquina de la familia IL-6, o con la secuencia de ADN que la codifica, y con el interferón-alfa, o con la secuencia de ADN que lo codifica.
- 60 17. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, **caracterizada** porque la citoquina de la familia IL-6 y el interferón-alfa están vehiculizados en sendos agentes vehiculizantes.
- 65 18. Un kit farmacéutico para el tratamiento de una enfermedad viral, **caracterizado** porque comprende al menos:  
- un primer componente que comprende al menos una citoquina de la familia IL-6 -familia gp130- o una secuencia de ADN que codifica dicha citoquina; y

## ES 2 302 402 B1

- un segundo componente que comprende al menos un interferón-alfa o una secuencia que codifica dicho interferón-alfa.

5 19. Un kit según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la citoquina de la familia IL-6 se ha seleccionado entre la IL-6, la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia, oncostatina M, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, la citoquina semejante a la cardiotrofina y combinaciones de las mismas.

10 20. Un kit según la reivindicación 18 ó 19, **caracterizado** porque la citoquina de la familia IL-6 es cardiotrofina-1 u oncostatina M.

15 21. Un kit según una de las reivindicaciones 18 a 20, **caracterizado** porque la citoquina de la familia IL-6 está seleccionada entre la proteína nativa completa, una secuencia polipeptídica parcial de dicha citoquina que mantiene los efectos fisiológicos de la citoquina completa y una secuencia polipeptídica que tenga una homología con dicha citoquina nativa superior al 80% y que mantenga los efectos fisiológicos de la citoquina completa.

22. Un kit según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el interferón-alfa se ha seleccionado entre el interferón-alfa-2a, interferón-alfa-2b, interferón-alfa-5, interferón consenso, interferón-alfa purificado, interferón-alfa pegilado y combinaciones de los mismos.

20 23. Un kit según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el interferón-alfa se ha seleccionado entre interferón-alfa-2b pegilado, interferón-alfa-2a pegilado, interferón-alfa-5 pegilado y combinaciones de los mismos.

25 24. Un kit según una de las reivindicaciones 18 a 23, **caracterizado** porque comprende además un tercer componente que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente compatibles con la citoquina de la familia IL-6, o la secuencia de ADN que la codifica, y con el interferón-alfa o la secuencia de ADN que lo codifica.

30 25. Un kit según una de las reivindicaciones 18 a 24, **caracterizado** porque comprende además un tercer componente que comprende uno o más agentes vehiculizantes farmacéuticamente compatibles con la citoquina de la familia IL-6 y con el interferón-alfa.

26. Un kit según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el primer componente comprende además al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y compatible con la citoquina de la familia IL-6 y con el interferón-alfa.

35 27. Un kit según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el segundo componente comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables y compatibles con la citoquina de la familia IL-6 y con el interferón-alfa.

40 28. Un kit según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el primer y el segundo componente están presentes en composiciones farmacéuticas separadas.

29. Un kit según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el primer y el segundo componente están presentes en una misma composición farmacéutica.

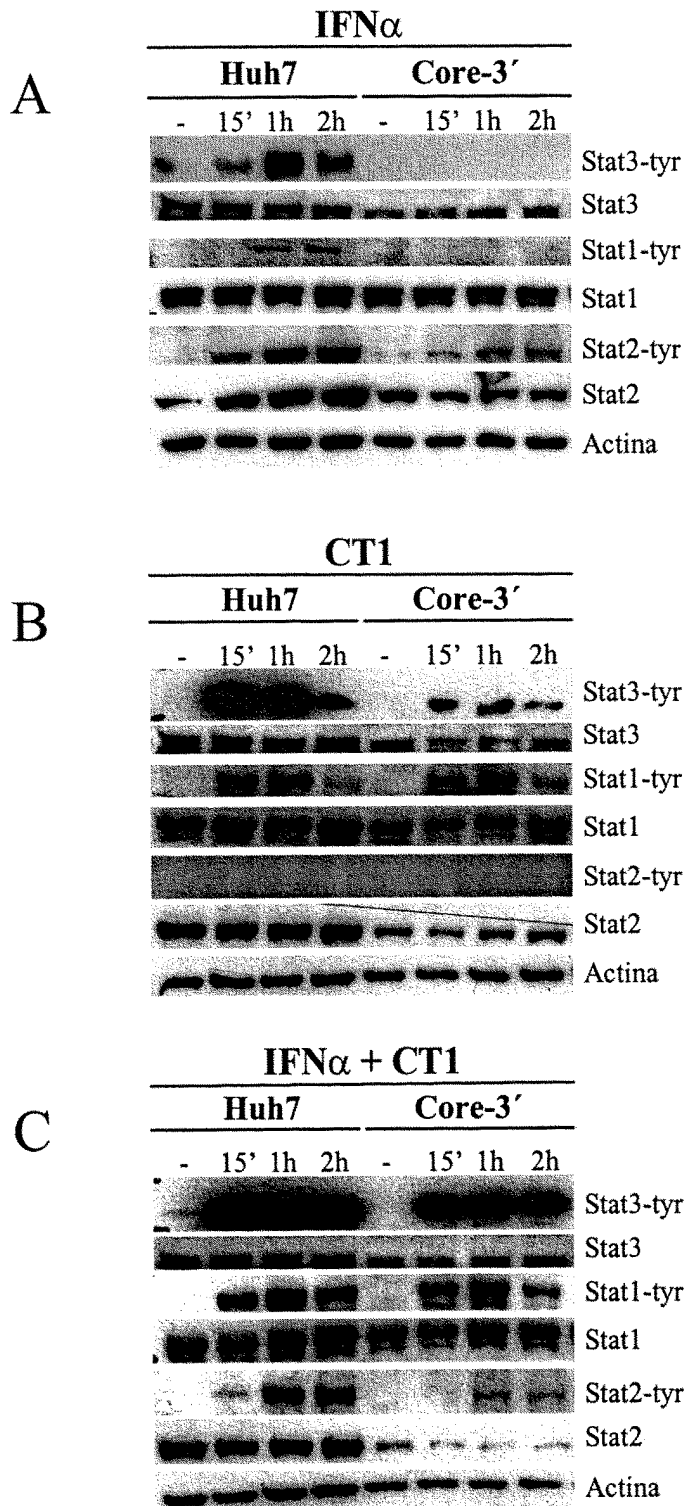
45

50

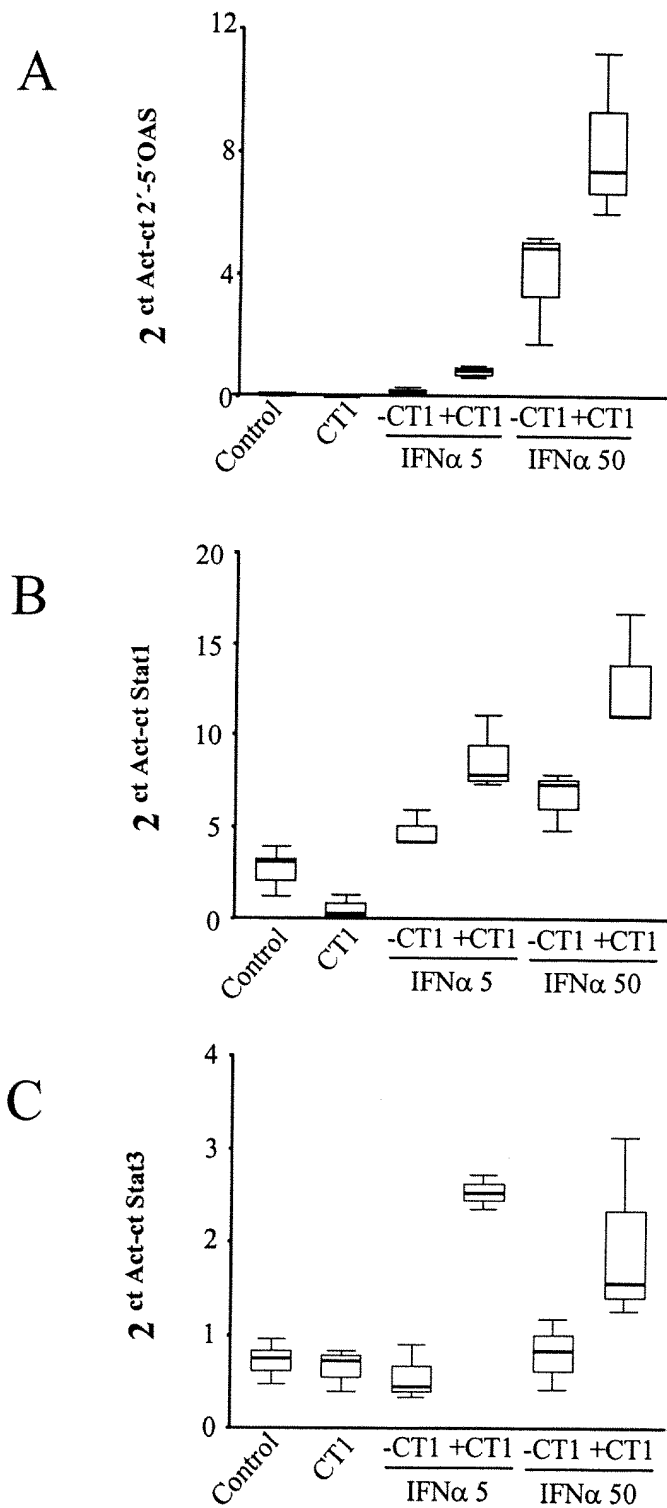
55

60

65



**Figura 1**



**Figure 2**

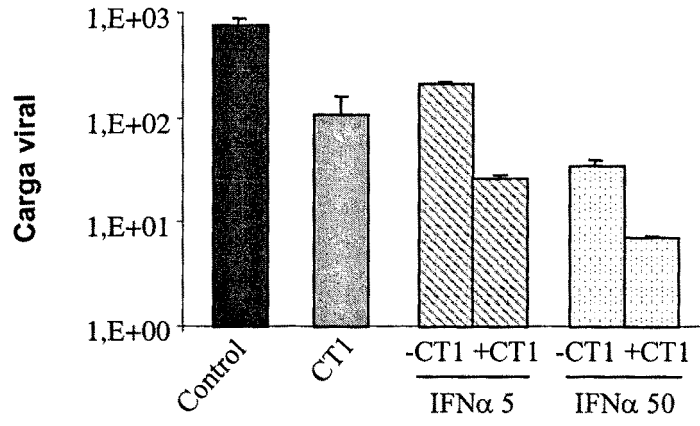


Figura 3

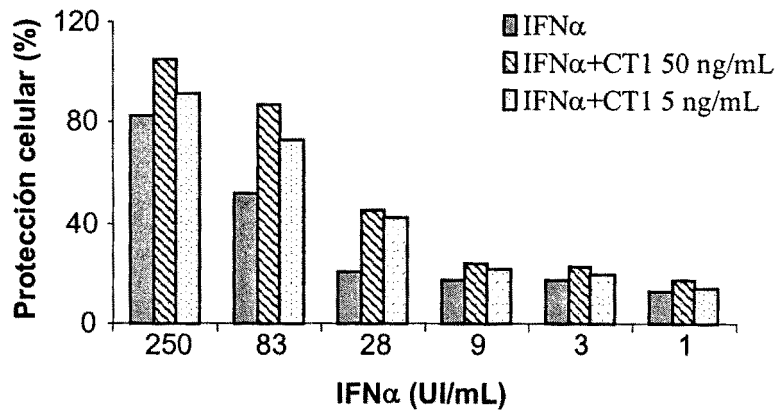
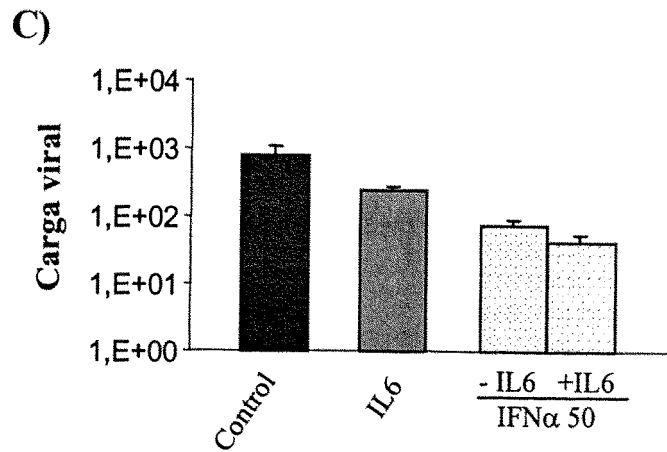
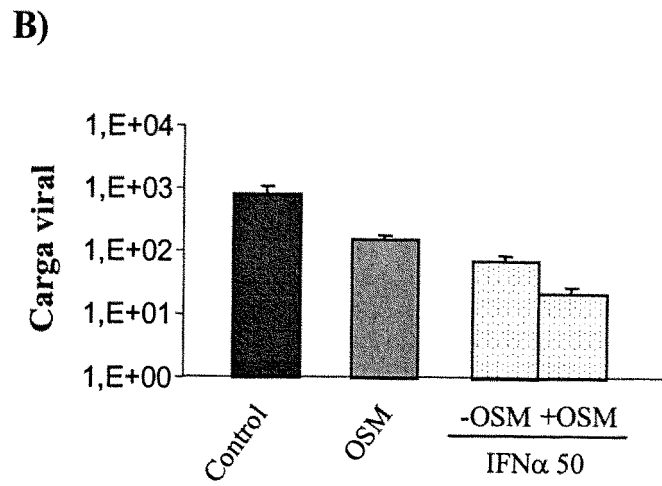
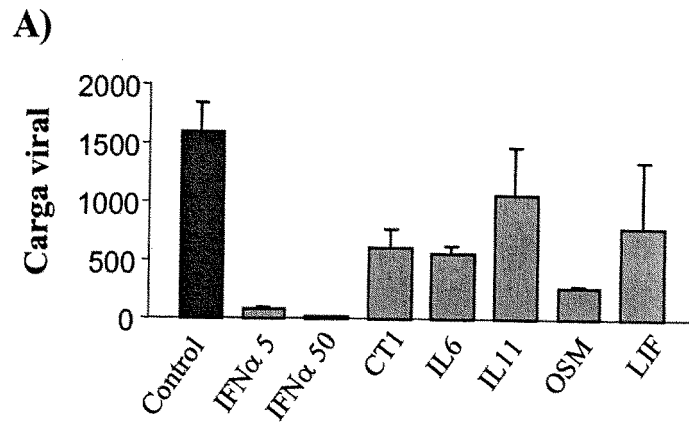


Figura 4





**Figura 5**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 302 402

② Nº de solicitud: 200501468

③ Fecha de presentación de la solicitud: 16.06.2005

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 9716204 A1 (SCHERING CORPORATION) 09.05.1997, todo el documento.	1-29
A	WO 9907409 A1 (SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (SCRAS)) 18.02.1999, todo el documento.	1-29
A	ES 2006776 A6 (GENETICS INSTITUTE, INC) 16.05.1989, columna 6, líneas 17-29.	1-29
A	ES 2224246 T3 (F. HOFFMANN-LA ROCHE, AG.) 01.03.2005, página 3, líneas 9-18; reivindicación 1.	1-29
A	WO 0037096 A2 (SCHERING CORPORATION) 29.06.2000, reivindicaciones 11-12.	1-29

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

09.06.2008

Examinador

M<sup>a</sup> D. García Grávalos

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 14/56** (2006.01)