

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 334 961**

21 Número de solicitud: 200801780

51 Int. Cl.:

**A61K 31/235** (2006.01)

**A61P 31/20** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **12.06.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2010**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**17.03.2010**

71 Solicitante/s:

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Fundación para la Investigación Biomédica del  
Hospital Universitario Ramón y Cajal**

72 Inventor/es: **González Porqué, Pedro;  
López Carrascosa, Ángel y  
Revilla Novella, Yolanda**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

54 Título: **Empleo de lauril galato en la prevención y tratamiento de infecciones causadas por el virus de la peste porcina africana (VPPA).**

57 Resumen:

Empleo de lauril galato en la prevención y tratamiento de infecciones causadas por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

La presente invención se relaciona con el uso de lauril galato, o un derivado del mismo, en la elaboración de una composición farmacéutica antiviral para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades provocadas por la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

ES 2 334 961 A1

## DESCRIPCIÓN

Empleo de lauril galato en la prevención y tratamiento de infecciones causadas por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

**Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el empleo del lauril galato (LG) como agente terapéutico, en particular, como agente antiviral en la prevención y tratamiento de las infecciones causadas por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

**Antecedentes de la invención**

El virus de la peste porcina africana (VPPA) es un virus de gran tamaño con morfología icosaédrica que causa una grave enfermedad en cerdos tanto domésticos como salvajes. Morfológicamente, el virus es muy similar a los iridovirus que infectan a vertebrados, e inicialmente fue considerado como un miembro de dicha familia. Sin embargo, su estructura genómica, así como otras características bioquímicas son similares a las de los poxvirus. Recientemente, el VPPA ha sido clasificado en una nueva familia denominada Asfarviridae de la que es el único miembro.

El VPPA es un importante patógeno porcino que puede transmitirse por contacto o mediante picaduras de artrópodos del género *Ornithodoros*. El periodo de incubación está comprendido entre 5 y 15 días. La enfermedad aguda causada por este virus se caracteriza por fiebre alta, hemorragias en el sistema reticuloendotelial y una alta tasa de mortalidad. Desde su descubrimiento en 1921 en el Este de África, la enfermedad se ha extendido a Europa y al hemisferio occidental, y de forma importante a España, causando la muerte de varios cientos de miles de cerdos domésticos. No existe vacuna ni tratamiento específico contra la peste porcina africana (PPA). La única estrategia eficaz para el control de la enfermedad se basa en el diagnóstico rápido y sensible en el foco de infección, seguido del sacrificio de la totalidad de la población porcina del establecimiento, y de su aislamiento y desinfección para asegurar la desaparición tanto del patógeno como de los posibles agentes transmisores de la enfermedad, fundamentalmente garrapatas.

Por otra parte, los derivados de ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) han sido extensamente estudiados, no solo por sus propiedades antioxidantes sino también porque los taninos, compuestos que se encuentran en gran variedad de plantas utilizadas como alimentos, así como en el vino y en el té, han suscitado un gran interés científico, especialmente en zonas donde el consumo de estos alimentos es elevado.

Se ha descrito el empleo de algunos ésteres del ácido gálico, e.g. propil, octil o lauril galato, debido a sus propiedades antioxidantes, como aditivos alimentarios para evitar el enranciamiento de grasas en salsas, quesos fundidos, pastelería, etc.

Asimismo, se ha descrito el empleo de algunos ésteres de ácido gálico como agentes antivirales así como agentes inhibidores de la proliferación de líneas celulares tumorales. En este sentido, se ha descrito el empleo del etil galato y del propil galato como agente antiviral frente a adenovirus, herpesvirus simplex tipo 1 (HSV-1), virus influenza, virus de la estomatitis vesicular (VSV), poliovirus, virus de la rabia, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) y citomegalovirus (CMV); así como el empleo del octil galato como agente antiviral frente a virus influenza, VSV, poliovirus, HIV-1 y CMV, entre otros. Sin embargo, no se ha descrito el empleo de ningún éster del ácido gálico como agente antiviral frente al VPPA.

El lauril galato (LG), también conocido como dodecil galato, es el éster de dodecanol y ácido gálico y se utiliza ampliamente como aditivo alimentario con el código E312, como antioxidante y como conservante; no obstante, también se ha descrito su empleo para inhibir la proliferación de líneas celulares tumorales [Serrano *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 1998, 350, 49-54] y para inducir apoptosis celular [Roy *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 2000, 383, 206-214], así como su empleo como agente antiviral general frente adenovirus, HSV-1, HIV-1, virus de la rabia y frente al virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) [JP 2006306836; Chavez, JH *et al.*, *Veterinary Microbiology* (2006), 116 (1-3), 53-59; Savi, LA *et al.*, *Arzneimittel Forschung* (2005), 55 (1), 66-75; Nakashima, H *et al.* *Antiviral Research* (1992), 18 (1), 91-103].

A la vista de lo anterior, sigue existiendo la necesidad de proporcionar compuestos útiles como agentes antivirales potencialmente útiles en la prevención y/o tratamiento de infecciones causadas por el VPPA. Ventajosamente, dichos compuestos antivirales deberían ser eficaces y no deberían provocar efectos secundarios indeseables.

**Compendio de la invención**

Los inventores de la presente invención han encontrado que el lauril galato (LG) reduce significativamente la producción viral en modelos celulares inoculados con el VPPA. Los resultados se pueden extrapolar con fines terapéuticos o profilácticos en la población animal de riesgo. Dado que se trata de un compuesto con un perfil de toxicidad muy bajo, su uso como agente antiviral resulta muy adecuado y no requiere de ensayos clínicos complejos como ocurre con otros agentes antivirales.

## ES 2 334 961 A1

Este nuevo uso terapéutico del LG se basa en el resultado de unas investigaciones llevadas a cabo por los inventores sobre modelos de cultivos de células Vero que permiten el crecimiento del virus VPPA, en donde se puso de manifiesto, por una parte, que la viabilidad de células Vero se mantenía en presencia de LG hasta una concentración de aproximadamente 60  $\mu\text{M}$  (Ejemplo 1), y, por otra parte, que el LG reducía, de forma eficaz, la producción de diferentes aislados del VPPA tanto en células Vero (Ejemplo 2) como en macrófagos de cerdo (Ejemplo 3), impidiendo de este modo la infección productiva de dichas células y, por tanto, la diseminación de la infección causada por el VPPA.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con el empleo del LG, o de un derivado del mismo, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades provocadas por la infección causada por el VPPA.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el LG, o un derivado del mismo, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades provocadas por la infección causada por el VPPA.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad provocada por la infección causada por el VPPA en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de LG o de un derivado del mismo.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1A es una gráfica que muestra el efecto provocado por el LG en la viabilidad celular de diferentes cultivos celulares: (●) células Vero; ( $\Delta$ ) Sw Mac (macrófagos alveolares porcinos); y en cultivos de células BHK (■) [Ejemplo 1]. La Figura 1B es una gráfica que pone de manifiesto que un cultivo de células Vero, incubado durante 48 horas en presencia de LG 10  $\mu\text{M}$  y liberado del mismo, se comporta de forma semejante a un cultivo control de células Vero en cuanto a proliferación celular.

La Figura 2 es una gráfica que muestra el efecto de concentraciones crecientes de LG sobre la producción viral en cultivos de células Vero infectados con un VPPA adaptado a dicha línea celular.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el rendimiento en la producción de distintos aislados de campo de VPPA (Mozam'86, E70 y Uganda) en cultivos de macrófagos de cerdo en función de la cantidad de LG administrado a dichos cultivos.

### Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con el empleo del lauril galato (LG), o de un derivado del mismo, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades provocadas por la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

El LG es un compuesto conocido que se puede obtener sintéticamente mediante reacción de esterificación directa del ácido gálico con lauril alcohol (dodecanol) [J. Am. Chem. Soc., 1947, 69, 2003-2005]. No obstante, también se encuentra disponible comercialmente.

Tal como aquí se utiliza, el término “derivado” del LG incluye ésteres y éteres obtenidos por reacción de 1, 2 ó 3 de los grupos hidroxilo libres del LG con ácidos orgánicos o con alcoholes, respectivamente; estos compuestos (ésteres y éteres) se pueden hidrolizar dentro de la célula liberando el LG puesto que en las células existen los sistemas enzimáticos intracelulares necesarios para romper esas uniones y liberar el principio activo dentro de las células. Dichos derivados del LG (ésteres y éteres) serían, en general, más hidrofóbicos que el LG, lo que facilitaría una mayor absorción a través de las membranas celulares. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos derivados incluyen los derivados metoxi, epoxi, etc. (dentro de los éteres) y acetatos, propanoatos, etc. (dentro de los ésteres).

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “sujeto” incluye a cualquier animal que posee sistema inmunitario, preferentemente, un mamífero, por ejemplo, un suido tanto doméstico como salvaje (e.g., cerdos, jabalíes, etc.).

El término “VPPA”, tal como se utiliza en esta descripción, se refiere al virus de la peste porcina africana (VPPA) e incluye cualquier cepa de VPPA, independientemente de su procedencia, por ejemplo, la cepa española España 70 (E70); la cepa española España 75 (E75), una cepa altamente virulenta; la cepa española BA71V, que corresponde a una cepa de VPPA aislada en Badajoz en 1971 y adaptada a la línea celular estable Vero de riñón de mono; dicha cepa (BA71V) es apatógena y está secuenciada completamente (número de acceso [U18466](#)) (Yanez RJ *et al.* Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology*, 1995 Apr 1; 208(1):249-78); los aislados de campo Mozam'86, Uganda y E70 se han utilizado en previas publicaciones (Bustos MJ *et al.* Plaque assay for African swine fever virus on swine macrophages. *Arch. Virol.*, 2002; 147:1453-9) y forman parte de la colección propiedad de los inventores.

En una realización particular, para su administración en la prevención y/o tratamiento de infecciones provocadas por el VPPA, el LG, o un derivado del mismo, se formulará en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

## ES 2 334 961 A1

El término “vehículo, adyuvante y/o excipiente” se refiere a entidades moleculares o sustancias con las que se administra el ingrediente activo. Tales vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como aguas y aceites, incluyendo aquéllos de petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, disgregantes, humectantes, diluyentes, etc. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” de E.W. Martin.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, etc.), etc., preferentemente, por vía oral.

En una realización particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden 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. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán 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 y de su preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Para su aplicación en terapia el LG, o un derivado del mismo, se encontrará preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que el LG, o derivado del mismo, tiene 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 el LG, o derivado del mismo, son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente, superiores al 70%, más preferiblemente, superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95%.

Tal como aquí se utiliza, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de componente activo (LG o derivado del mismo) calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias del LG, o derivado del mismo, y el efecto terapéutico a conseguir. Dependerá asimismo del sujeto que vaya a ser tratado, de la severidad de la enfermedad que padezca dicho sujeto, 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 puede administrar el LG, una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 veces al día, en una cantidad típica total diaria comprendida entre 1 y 10 mg/kg masa corporal/día, preferentemente 1 mg/kg masa corporal/día.

Aunque, en principio, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser utilizada para tratar cualquier sujeto, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es especialmente útil para tratar suidos (e.g., cerdos, jabalíes, etc.).

El LG o derivado del mismo así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos antivirales adicionales útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades provocadas por infecciones causadas por virus. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o secuencial a la de la composición farmacéutica que comprende el LG o un derivado del mismo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el LG, o un derivado del mismo, para el tratamiento y/o prevención de enfermedades provocadas por la infección causada por el VPPA. Las características del LG, así como las de sus derivados y las del VPPA ya han sido mencionadas previamente.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad provocada por la infección causada por el VPPA en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de LG o de un derivado del mismo. Las características del LG, las de sus derivados, las del VPPA y las del sujeto ya han sido mencionadas previamente. En una realización particular, dicho sujeto es un cerdo, doméstico o salvaje, e.g., un cerdo, un jabalí, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

### Ejemplos

#### *Materiales*

Para la realización de estos ensayos se utilizaron las células y los virus que se indican a continuación.

*Células*

Se utilizaron células Vero, células BHK y macrófagos alveolares de cerdo. Las células Vero (procedentes de riñón de mono africano) y las células BHK (procedentes de riñón de hamster) fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con L-glutamina 2 mM, 100 U de gentamicina/mL y aminoácidos no esenciales. Los macrófagos alveolares de cerdo fueron recogidos mediante lavado bronco-alveolar [Carrascosa AL, Santaren JF y Vinuela E. Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J. Virol. Methods*, 1982; 3:303-10. Se cultivaron las células a 37°C en medio suplementado bien con 5% de suero de ternera recién nacido (células Vero), o bien con 5% de suero de ternera fetal inactivado por calor (células BHK), o bien con 10% de suero homólogo porcino (macrófagos alveolares de cerdo).

*Virus*

Asimismo, se utilizaron diversos aislados del virus de la peste porcina africana (VPPA). La cepa BA71V de VPPA adaptada a células Vero fue propagada y titulada mediante un ensayo en placa sobre células Vero (Enjuanes L *et al.* Titration of African swine fever (ASF) virus. *J. Gen. Virol.*, 1976; 32:471-7). Otros aislados de campo de VPPA (E70, Uganda y Mozam'86) fueron propagados a partir de stocks congelados sobre macrófagos de cerdo (Carrascosa AL, Santaren JF y Vinuela E. Production and titration of African swine fever virus in porcine alveolar macrophages. *J. Virol. Methods*, 1982; 3:303-10; García Barreno *et al.* Monoclonal antibodies of African swine fever virus: antigenic differences among field virus isolates and viruses passaged in cell culture. *J. Virol.* 1986; 58(2):385-92) y titulados mediante hemadsorción y ensayo en placa (Enjuanes L *et al.* Titration of African swine fever (ASF) virus. *J. Gen. Virol.*, 1976; 32:471-7; Bustos MJ *et al.* Plaque assay for African swine fever virus on swine macrophages. *Arch. Virol.*, 2002; 147:1453-9).

## Ejemplo 1

*Ensayo MTT de viabilidad y proliferación celular*

Para determinar el efecto tóxico del tratamiento con LG en distintos cultivos celulares (células Vero, células BHK y macrófagos alveolares de cerdo) se realizó este ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Brevemente, células Vero, células BHK y macrófagos alveolares de cerdo, a razón de 30.000 células por pocillo, fueron sembrados en placas de 96 pocillos (MW96) e incubados durante 24 horas antes de la adición de LG. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100  $\mu$ L de medio de cultivo con concentraciones crecientes de LG para proporcionar concentraciones finales comprendidas entre 0 y 100  $\mu$ M en un volumen de 0,1 mL por pocillo. Se utilizaron 6 pocillos para cada concentración de LG, y se mantuvieron 2 pocillos en paralelo con el medio correspondiente pero en ausencia de células con el fin de sustraer el valor de fondo (background) debido al LG en el medio de cultivo. Tras 24-48 horas de incubación, la placa se centrifugó a 1.000 rpm, durante 3 minutos y se retiraron 90  $\mu$ L de sobrenadante. A continuación, se añadieron 10  $\mu$ L/pocillo del indicador MTT (7,5 mg/mL en tampón fosfato salino (PBS)) y se llevó hasta 100  $\mu$ L con medio de cultivo fresco. Posteriormente, los cultivos celulares se incubaron durante 2 horas a 37°C y se mantuvieron en oscuridad durante el resto del ensayo. Seguidamente, se añadieron 100  $\mu$ L de tampón de lisis que contenía dodecilsulfato sódico (SDS) [20 g de SDS, 50 mL de N,N-dimetilformamida, 2,5 mL de ácido acético 99%, 2,5 mL de HCl 1 N, completado hasta 100 mL con agua destilada]. A continuación, los cultivos celulares se incubaron durante 15 minutos a 37°C con agitación suave. La viabilidad celular fue determinada mediante la medida del cambio de color experimentado por el indicador MTT a 550 nm en un lector de microplacas. Los valores del fondo (background) se restaron de los valores promedio de absorbancia obtenidos para cada concentración de LG ensayada y se refirieron al valor obtenido en ausencia de LG (100% viabilidad). A efectos comparativos se debe determinar la CC<sub>50</sub>, es decir, la concentración de inhibidor (LG) que reduce la viabilidad celular al 50%.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1A, donde puede apreciarse que:

- la viabilidad de células BHK se mantiene en presencia de LG (tras 48 horas de incubación) hasta una concentración de aproximadamente 20  $\mu$ M;
- la viabilidad de macrófagos alveolares porcinos se mantiene en presencia de LG (tras 24 horas de incubación) hasta una concentración de aproximadamente 30  $\mu$ M; y
- la viabilidad de células Vero se mantiene en presencia de LG (tras 24 horas de incubación) hasta una concentración de aproximadamente 60  $\mu$ M.

A la vista de los resultados obtenidos se seleccionó una concentración de trabajo de LG de 10  $\mu$ M para tratamientos no citotóxicos de 24-72 horas en cultivos celulares.

Adicionalmente, para analizar el comportamiento de las células Vero en cuanto a proliferación celular, se incubaron células Vero durante 48 horas en presencia de LG 10  $\mu$ M; transcurrido ese periodo de tiempo, los cultivos de células Vero fueron liberados de LG. Como control se utilizaron cultivos de células Vero con el mismo número inicial de células Vero pero sin LG. Los resultados se muestran en la Figura 1B donde puede apreciarse que los cultivos de

## ES 2 334 961 A1

células Vero incubados 48 horas en presencia de LG 10  $\mu\text{M}$  y liberados del LG, se comportaron igual que los cultivos control de células Vero (sin LG) en cuanto a proliferación celular.

### 5 Ejemplo 2

#### *Efecto del LG en la producción viral de células Vero en cultivo*

Se realizó este ensayo para analizar el efecto del LG (Sigma) sobre la infectividad del VPPA en células Vero susceptibles de ser infectadas por el virus previamente tratadas con LG.

La solución stock de LG se preparó a una concentración 40 mM en etanol y se almacenó en oscuridad a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo. A partir de ese stock se preparó una solución 10 mM de LG en etanol, de la que se pueden derivar otras más diluidas (e.g., 1 y 0,1 mM) en medio de cultivo sin que precipite el LG.

Células Vero cultivadas en placas multipocillos (MW6), con 7  $\text{cm}^2$  de superficie/pocillo, a aproximadamente 100.000 células/ $\text{cm}^2$ , fueron pretratadas, antes de la infección con VPPA, durante 1 hora, con la dosis correspondiente de LG (0 - 100  $\mu\text{M}$ ). Posteriormente, se retiró el medio y se inoculó el virus VPPA BA71V (adaptado a células Vero) a una multiplicidad de infección (m.d.i.) de 2 unidades formadoras de placa (ufp)/célula, en un volumen reducido (en torno al 30%) manteniendo la concentración correspondiente de LG durante la adsorción viral, y se dejó incubar durante 1-2 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el inóculo y se lavó 2 veces con medio fresco para eliminar el virus no adsorbido. A continuación, se repusieron 2 mL de medio fresco a los pocillos, suplementando con la concentración correspondiente de LG, y se dejó incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta observar un efecto citopático masivo en cultivos control de células Vero infectadas con VPPA pero en ausencia de LG (los cultivos control fueron infectados en paralelo en presencia de la misma cantidad de etanol presente en las muestras tratadas con LG). Normalmente, el efecto citopático total en dichos cultivos control se observaba a las 24 horas post-infección. Finalmente, se procedió a valorar la producción total de virus infectivo mediante un ensayo de plaqueo sobre monocapas de células Vero en muestras duplicadas, tal como se ha descrito previamente (Enjuanes *et al.* Titration of African swine fever (ASF) virus, 1976; *J. Gen. Virol.* 32:471-7).

Para comprobar que la infección viral no era inhibida por el disolvente (etanol), el experimento se realizó en paralelo añadiendo la cantidad correspondiente de etanol presente en los tratamientos con LG. En el caso de células Vero está confirmada la ausencia de efecto inhibitorio hasta 20  $\mu\text{L}$  de etanol por pocillo (con 2 mL de medio de cultivo) en todos los ensayos realizados.

A efectos comparativos se debe determinar la  $\text{EC}_{50}$ , es decir, la concentración de inhibidor (LG) que reduce la producción viral al 50%. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2, donde puede apreciarse que la  $\text{EC}_{50}$  es de 1,5  $\mu\text{M}$  para el LG.

### 40 Ejemplo 3

#### *Efecto del LG en la producción de distintos aislados de campo del VPPA por macrófagos de cerdo*

Se realizó este ensayo para analizar el efecto del LG sobre la infectividad de distintos aislados de campo del VPPA en macrófagos de cerdo. El ensayo se realizó en condiciones análogas a las descritas en el ejemplo 1, excepto en el uso de otro tipo de cultivo celular (macrófagos de cerdo) que se infectó con aislados de campo del VPPA (cepas Mozam'86, E70 ó Uganda) en presencia de concentraciones crecientes de LG. La producción de virus infectivo se analizó por hemadsorción (Enjuanes L *et al.* Titration of African swine fever (ASF) virus, 1976; *J. Gen. Virol.* 32:471-7) y plaqueo (Bustos MJ *et al.* Plaque assay for African swine fever virus on swine macrophages. *Arch. Virol.*, 2002; 147:1453-9) sobre cultivos de macrófagos de cerdo. En la Figura 3 se puede observar que la inhibición de la producción viral se produce también en el rango de 1 a 10  $\mu\text{M}$  de LG para los 3 aislados virales, pudiéndose calcular una  $\text{EC}_{50}$  del orden de 2-3  $\mu\text{M}$  para el LG.

55

60

65

# ES 2 334 961 A1

## REIVINDICACIONES

5 1. Uso de lauril galato o de un derivado del mismo en la elaboración de una composición farmacéutica antiviral para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades provocadas por la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

2. Uso según la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica es una composición para su administración por vía oral, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa.

10 3. Uso según la reivindicación 1, en donde dicha composición farmacéutica es administrada en combinación con un fármaco antiviral.

15 4. Uso según la reivindicación 3, en donde dicho fármaco antiviral se administra en forma de una composición separada para su administración simultánea o secuencial a la de la composición farmacéutica que comprende lauril galato, o un derivado del mismo, según la reivindicación 1.

20 5. Lauril galato para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades provocadas por la infección causada por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

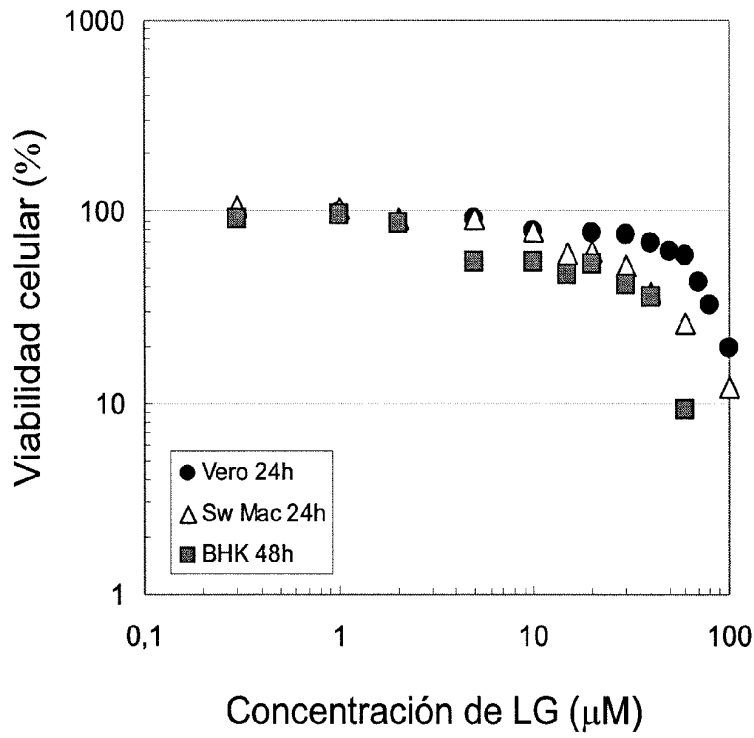


Figura 1A

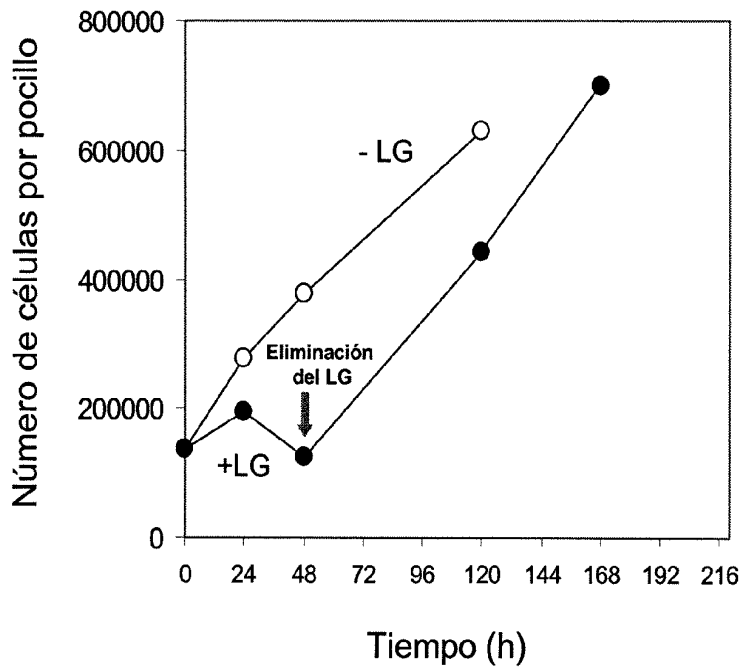
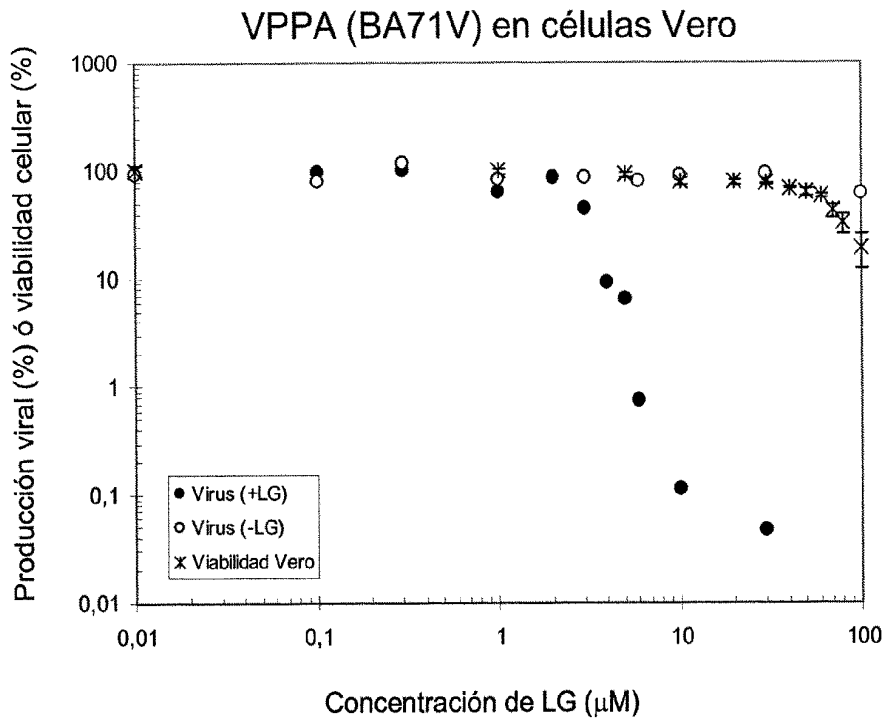


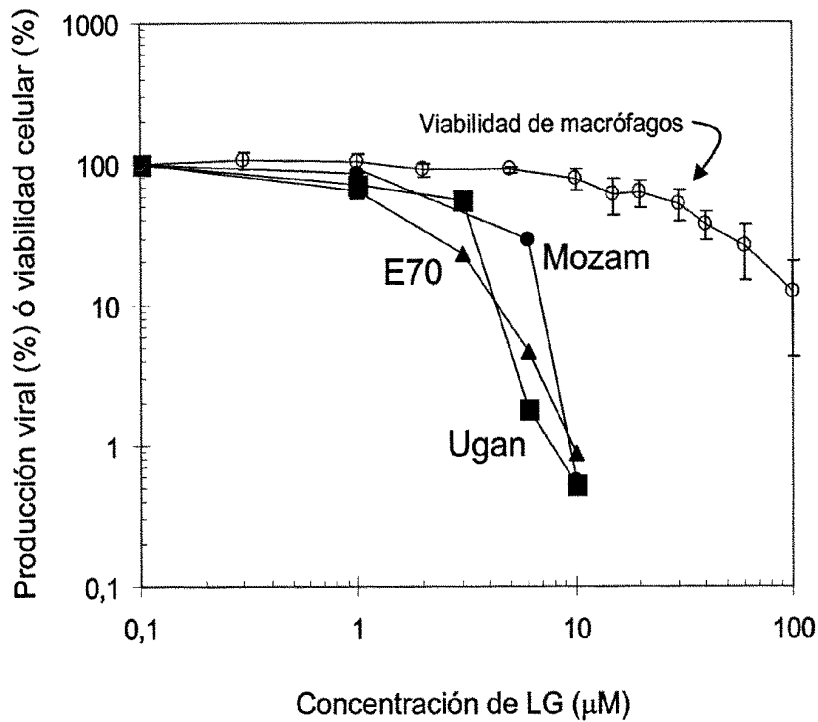
Figura 1B





**Figura 2**

**Aislados de campo del VPPA en macrófagos de cerdo**



**Figura 3**



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 334 961

⑫ Nº de solicitud: 200801780

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 12.06.2008

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: **A61K 31/235** (2006.01)  
A61P 31/20 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	UOZAKI, M., et al. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. Antiviral Research. Febrero 2007. Vol. 73, nº 2, páginas 85-91. ISSN 0166-3542. Ver todo el documento.	5
A		1-4
X	YAMASAKI, H. et al. Antiviral effect of octyl gallate against influenza and other RNA viruses. International Journal of Molecular Medicine. Abril 2007. Vol. 19, nº 4, páginas 685-688 ISSN 1107-3756. Ver todo el documento.	5
A		1-4

**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**

03.03.2010

**Examinador**

B. Pérez Esteban

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

**OPINIÓN ESCRITA**

Nº de solicitud: 200801780

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.03.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 5	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-4	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 5	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	UOZAKI, M., et al.	02-2007
D02	YAMASAKI, H. et al.	04-2007

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud de patente objeto de esta opinión escrita se refiere al empleo de lauril galato como medicamento antiviral en enfermedades causadas por el virus de la peste porcina africana (VPPA).

Hay numerosos documentos del estado de la técnica que describen el compuesto lauril galato para diversos usos. En este informe se citan, como ejemplo, dos de ellos. Por tanto, a la luz de lo divulgado en los documentos D01 y D02, la reivindicación 5 no cumple los requisitos de novedad ni de actividad inventiva de los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que divulguen el uso de lauril galato reivindicado en la presente solicitud, por lo que se trataría de un segundo uso médico, y las reivindicaciones 1 a 4 de la invención se consideran nuevas y con actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la mencionada ley.

Los documentos citados en este informe describen la capacidad antiviral del lauril galato, pero en ninguno de ellos se emplea en tratamiento de la peste porcina africana.

Así, en el documento D01, los autores estudian el efecto negativo que el ácido gálico y sus derivados alquil éster tienen en el crecimiento e infectividad de distintos tipos de virus, entre los que no incluyen el VPPA. Del mismo modo que en la solicitud, se utilizan células Vero para crecer los virus, y entre los compuestos incluidos en los ensayos se encuentra el lauril galato, y se menciona su alta actividad antiviral. Sin embargo, no se estudia el efecto de estos compuestos sobre el virus VPPA, por lo que el documento D01 no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 4 de la solicitud.

En el documento D02 se describe un método muy semejante al de D01, en el que se estudia de nuevo el efecto antiviral de varios derivados del ácido gálico (incluido el lauril galato). El análisis se centra especialmente en el efecto del octil galato, y, como en D01, los virus estudiados no incluyen el de la peste porcina africana. Por ello, tampoco D02 afectaría la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 4 de la solicitud.