



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 185**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/15** (2006.01)

**A61K 31/7072** (2006.01)

**A61K 31/513** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06783790 .6**

96 Fecha de presentación : **08.08.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1933823**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2008**

54

Título: **Composición farmacéutica basada en inhibidor de la transcriptasa inversa y meldonio.**

30

Prioridad: **15.08.2005 LV 050095**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.06.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.06.2011**

73

Titular/es: **Latvian Institute of Organic Synthesis  
Aizkraukles Street 21  
1006 Riga, LV**

72

Inventor/es: **Klusha, Vija;  
Isajevs, Sergejs;  
Pupure, Jolanta;  
Rumaks, Juris;  
Gordjushina, Valentina;  
Taivans, Immanuels y  
Kalvinsh, Ivars**

74

Agente: **Martín Santos, Victoria Sofia**

ES 2 361 185 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica basada en inhibidor de la transcriptasa inversa y meldonio

5 **Campo Técnico**

Esta invención se refiere a un novedoso uso terapéutico de Meldonio y a composiciones farmacéuticas destinadas a disminuir la toxicidad producida por medicamentos del tipo inhibidores de la transcriptasa inversa.

10 **Técnica Anterior**

Se sabe que la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana es una de las infecciones más frecuentes altamente peligrosas que ha contagiado a 37,7 millones de personas adultas y 2,2 millones de niños en el último año 2004 BROCKLEHURST, P, *et al.* Antiretrovirals for Reducing the Risk of Mother-to-Child Transmission of HIV Infection. Cochrane Database Syst Rev. 2002, n.º.2.

En el tratamiento del VIH/SIDA, los compuestos más ampliamente usados son Zidovudina (AZT), Estavudina y Lamivudina que inhiben la polimerasa- $\gamma$ , un catalizador responsable de la replicación del ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) del VIH-1. Por tanto, la Zidovudina, Estavudina y Lamivudina bloquean la formación de nuevas mitocondrias y producen otros efectos secundarios.

El Meldonio, químicamente, 3- (2,2,2-trimetilhidrazinio) propionato se describe en el documento US 4481218 (INST ORGAN-ICHESKOGO SINTEZA AK (SU)) 08.07.1982.

25 El Meldonio se aplica ampliamente en medicina como un fármaco anti-isquémico y protector frente al estrés en el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares y otras patologías que implican isquemia.

30 La Zidovudina, químicamente, 3'-azido-3'- desoxitimidina; azidotimidina; o AZT es un inhibidor de la transcriptasa inversa. Los usos terapéuticos de la Zidovudina, compuestos relacionados y sus preparaciones se describen en el documento US 4724232 (BURROUGHS WELLCOME CO (US)) 17.09.1985.

La Zidovudina se encuentra disponible en el mercado como cápsula de 100 mg, comprimido de 300 mg, vial monodosis de 10 mg/ml en 20 ml y jarabe 50 mg/5 ml en 240 ml.

35 La Lamivudina, químicamente, (2R-cis)-4-Amino-1-[2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]-2(1H)- pirimidona; (-)-2'-desoxi-3'-tiacitidina; (-)-1-[(2R,5S)-2-(hidroximetil)-1,3-oxatiolan-5-il]citosina; o 3TC es un inhibidor de la transcriptasa inversa. Los usos terapéuticos de la Lamiduvina, compuestos relacionados y sus preparaciones se describieron en el documento WO 9117159 (IAF BIOCHEM INT (CA)) 02.05.1991.

40 La Lamivudina se encuentra disponible en el mercado como comprimidos de 100 mg, 150 mg y 300 mg; solución oral de 10 mg/ml en 240 ml.

45 La Estavudina, químicamente, 2', 3'-didehidro-3'-desoxitimidina; 1-(2,3-didesoxi- $\beta$  -glicero-pent-2-enofuranosil) timina; o 3'-desoxi-2'-timidineno es un inhibidor de la transcriptasa inversa. Los usos terapéuticos de la estavudina, compuestos relacionados y sus preparaciones se describieron en el documento US 5130421 (BRISTOL MYERS CO (US)) 29.04.1991.

50 La Estavudina se encuentra disponible en el mercado como cápsulas de 15 mg, 20 mg, 30 mg y 40 mg; y solución oral de 1 mg/ml en 200 ml.

Se conocen diversas estrategias de cómo pueden limitarse las reacciones adversas producidas por la toxicidad de la Zidovudina, Estavudina y Lamivudina. No obstante, ninguna tiene efecto simultáneo en el funcionamiento de cardiomiocitos y neuronas.

55 Con objeto de disminuir el daño mitocondrial, en casos particulares se recomienda el uso adicional de antioxidantes, por ejemplo dosis muy elevadas de vitamina C y vitamina E, ROCKLEHURST, P, *et al.* Antiretrovirals for Reducing the Risk of Mother-to-Child Transmission of HIV Infection. Cochrane Database Syst Rev. 2002, n.º.2. ; FICHTENBAUM, C.J. Coronary Heart Disease Risk, Dyslipidemia, and Management in HIV-Infected Persons. HIV Clin Trials. 2004 nov-dic, vol.5, n.º.6, págs.416-433.

60 En ensayos con ratones se ha demostrado que dosis diarias de vitamina C de 1,250 mg/kg y dosis diarias de vitamina E de 75 mg/kg protegen a las mitocondrias del estrés oxidativo y también reducen la actividad de la aspartato aminotransferasa (AST) y de la lactato deshidrogenasa (LDH) y también limitan el daño de la ultraestructura mitocondrial. De manera similar la actividad de la creatina quinasa (CK) disminuye lo que refuerza, en el caso de la zidovudina, la solicitud de PETERS, B.S., *et al.* Mitochondrial Myopathy Associated with Chronic Zidovudine Therapy in AIDS. Q J Med 1993 enero, vol. 86, n.º.1, págs. 5-15.

La coenzima Q10 puede considerarse como otra sustancia que puede ejercer una influencia positiva en la prevención de reacciones adversas de la zidovudina, activando la transferencia de electrones en la cadena respiratoria; supuestamente, la riboflavina, el tocoferol, succinatos, ácido ascórbico, Menadiona y nicotinamida inhiben el bloqueo de la cadena en la respiración LARSSON , N.G., *et al.* Mitochondrial Myopathies. Acta physio Scand. 2001, nº.171, págs. 225-233.

El documento WO 9705864 (SIGMA TAU IND FARMACEUTI (IT); MENDES SRL (IT); MORETTI SONIA (IT)) 19.07.1996 proporciona información en lo que respecta al uso novedoso de la L-carnitina, sus derivados y sus sales farmacológicamente aceptables, en combinación con fármacos antirretrovirales para reducir niveles de ceramida, potenciando la actividad de los fármacos antirretrovirales mencionados anteriormente para el tratamiento terapéutico de infección por VIH y SIDA y potenciando el sistema inmunitario afectado por estos fármacos.

En el documento EP 0560275 A (SIGMA TAU IND FARMACEUTI (IT)) 09.03.1993 se describió una utilización terapéutica novedosa de la L-carnitina y sus sales farmacológicamente aceptables para el tratamiento de pacientes VIH seropositivos con disminución de carnitina.

### Descripción de la invención

#### Problema Técnico

En el tratamiento del SIDA, la Zidovudina (AZT), Estavudina y Lamivudina, se usan más ampliamente ya que inhiben la polimerasa- $\gamma$ , una enzima responsable de la replicación del ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) del VIH-1. Por lo tanto, la Zidovudina, Estavudina y Lamivudina bloquean la formación de nuevas mitocondrias.

Sin embargo, las formas de dosificación de fármacos y composiciones que contienen AZT, Estavudina y Lamivudina tienen una principal desventaja que consiste en restricciones de uso impuestas por los efectos adversos de la toxicidad de la AZT, Estavudina y Lamivudina (LEWIS , W, *et al.* Zidovudine Induces Molecular, Biochemical, and Ultrastructural Changes in Rat Skeletal Muscle Mitochondria. Journal of Clin Invest. 1992 Apr, vol.89, nº.4, p.1354-1210.; SZABADOS , E, *et al.* Role of Reactive Oxygen Species and Poly-ADP-ribose Polymerase in the Development of AZT-induced Cardiomyopathy in Rat. Free Radic Biol Med. 1999 feb, vol.14, nº.3-4, págs.189-197.; BLANCO , F. First-line Therapy and Mitochondrial Damage: Different Nucleosides, Different Findings.. HIV Clin Trials. 2003 ene-feb, vol.4, nº.1, págs. 11-19.; BISHOP , J.B, *et al.* Mi-tochondrial Damage Revealed by Morphometric and Semiquantitative Analysis of Mouse Pup Cardiomyocytes Following in Utero and Postnatal Exposure to Zidovudine and Lamivudine. Toxicol Sci. 2004, vol.81, nº.2, págs.512-517.

La toxicidad de la AZT está muy asociada también con su capacidad para incorporarse en las mitocondrias (NUSBAUM , N. J. AZT Incorporation into Mitochondria: Study in Human Myeloid Cell Line. DNA Cell Biol. 1996, nº.15, págs.363-366.) lo que ocasiona la eliminación del ADNmt y citocromo C (CYC) en ellas. Al mismo tiempo se observa una disminución de la actividad de las enzimas de fosforilación oxidativa. Esto induce la disminución del nivel de adenosina trifosfato (ATP) producido por las mitocondrias y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo tanto se intensifica la respiración celular anaerobia y la acumulación de lactato.

Los efectos tóxicos de la zidovudina y lamiduvina aparecen clínicamente como una miopatía de los miocitos producida por patologías mitocondriales que adicionalmente surgen debido a la propia infección por el VIH (PETERS, B.S., *et al.* Myopathy Associated with Chronic Zidovudine Therapy in AIDS. Q J Med. 1993 enero, vol.86, nº.1, págs.5-15. ; BAKKER, H.D., *et al.* Vitamin-Responsive Complex-1 Deficiency in a Myopathic Patient with Increased Activity of the Terminal Respiratory Chain and Lactic Acidosis. J Inherit Metab Dis. 1994, nº.17, pag.196-204; SULKOWSKI , M.S., *et al.* Hepatic Steatosis and Antiretroviral Drug Use Among Adults Co-infected with HIV and Hepatitis C Virus. AIDS. 2005 marzo 24, vol.19, nº.6, págs. 585-592; LICHTERFELD, M., *et al.* Fatty Liver and Increased Serum Lactate in a Woman with HIV. Dtsch Med Wochenschr. 2003 enero 17, vol.98, nº.3, págs. 81-84. ; DE LA ASUNCION , J.G., *et al.* AZT Induces Oxidative Damage to Cardiac Mitochondria: Protective Effect of Vitamins C and E. Life Sci. 2004 noviembre 19, vol.76, nº.1, págs. 29-56. BISHOP , J.B., *et al.* Mitochondrial Damage Revealed by Morphometric and Semiquantitative Analysis of Mouse Pup Cardiomyocytes Following in Utero and Postnatal Exposure to Zidovudine and Lamivudine. Toxicol Sci. 2004, vol.81, nº.2, págs. 512-517.

La lesión mitocondrial normalmente afecta en primer lugar al funcionamiento de los miocitos ya que estos últimos se caracterizan por un consumo alto de energía LARSSON , N.G, *et al.* Mitochondrial Myopathies. Acta Physiol Scand. 2001, nº.171, págs. 225-233.

Es el músculo cardíaco el más gravemente afectado por las miopatías SZABADOS E., *et al.* Role of Reactive Oxygen Species and Poly-ADP-ribose Polymerase in the Development of AZT-induced Cardiomyopathy in Rat. Free Radic Biol Med 1999 febrero, nº.14, págs. 3-4 y 189-197; BISHOP, J.B., *et al.* Mitochondrial Damage Revealed by Morphometric and Semiquantitative Analysis of Mouse Pup Cardiomyocytes Following in Utero and Postnatal Exposure to Zidovudine and Lamivudine ToxicolSci. 2004, vol.81, nº.2, págs. 512-517; GERSCHENSON,

M., *et al.* Fetal Mitochondrial Heart and Skeletal Muscle Damage in Erythrocebus Patas Monkeys Exposed in Utero to 3'-azido-3'-deoxythymidine. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000 mayo 1, vol.16, n°.7, págs. 635-626 .

5 Con frecuencia la Zidovudina y otros inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI) (Lamivudina y Estavudina) crean neuropatía sensorial, tanto, que contribuyen al deterioro de la calidad de vida de los pacientes (Cherry *et al.*, *J Clin Virol* 2003, 26:195-207).

10 El principal problema es descubrir agentes que disminuyan la toxicidad producida por los medicamentos de tipo inhibidor de la transcriptasa inversa. Dichos agentes permitirían usar dosis eficaces de los inhibidores de la transcriptasa inversa con efectos adversos reducidos.

### Solución Técnica

15 En el intento de preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de infección por retrovirus, caracterizada esencialmente por una toxicidad más reducida, los autores de la invención descubrieron inesperadamente que, dosis adecuadas de la terapia usada en el entorno clínico de las composiciones farmacéuticas que contienen Meldonio [3-(2,2,2-trimetil hidrazinio) propionato dihidrato], un fármaco para el tratamiento de insuficiencia cardíaca, coadministrado o usado en composiciones farmacéuticas con Zidovudina, Lamivudina o Estavudina o algún otro inhibidor de la transcriptasa inversa conocido, clínicamente aplicable, previene eficazmente el daño a los miocitos, particularmente a los cardiomiocitos producido por los inhibidores de la transcriptasa inversa, que incluyen Zidovudina, Lamivudina y Estavudina.

Para reducir la toxicidad de los inhibidores de la transcriptasa inversa, se han propuesto diversas sustancias.

25 Por lo tanto, el efecto cardioprotector del Meldonio, que se sabe que reduce el nivel de carnitina y disminuye la actividad de la carnitina palmitoiltransferasa (DAMBROVA, M, *et al.* Mildronate: Cardioprotective Action through Carnitine-Lowering Effect. *Trends Cardiovasc Med* 2002, n°.9, págs.155-159), es inesperado y sorprendente.

30 En la técnica anterior se conocen bien composiciones farmacéuticas que contienen un inhibidor de transcriptasa inversa y Carnitina y el uso de un inhibidor de la transcriptasa inversa en combinación con Carnitina.

35 La Carnitina y el Meldonio son estructuralmente muy similares. Sin embargo, se ha considerado que el efecto farmacológico del Meldonio contrarresta el efecto de la Carnitina. Por consiguiente, para el experto habitual en la materia, no resulta obvio combinar un inhibidor de la transcriptasa inversa con Meldonio.

40 El sorprendente efecto del Meldonio tampoco puede explicarse mediante otra actividad. Como el Meldonio no se oxida en el organismo de animales de sangre caliente y de seres humanos, no puede considerarse como un antioxidante de acción directa que lo diferencie principalmente de las vitaminas o metabolitos reductores hasta ahora usados para impedir las reacciones adversas de la zidovudina, lamivudina y estavudina.

45 No existen referencias bibliográficas de que el Meldonio pudiera participar, como una molécula, en el transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Por lo tanto también difiere básicamente de la coenzima Q10, nicotinamida y sustancias similares posiblemente por tener dicho mecanismo de acción. De la misma manera, no existen datos de que el Meldonio tenga ninguna propiedad antiviral.

50 Como resultado, la capacidad inesperada, descubierta por los autores de la invención, del Meldonio en solitario o en composiciones terapéuticas que contienen inhibidores de transcriptasa inversa, por ejemplo zidovudina, lamivudina y estavudina y Meldonio o sus sales farmacéuticamente aceptables, para suprimir básicamente los efectos tóxicos adversos producidos por estos fármacos antivirales, en particular cardiomiopatía y neurotoxicidad, sin deteriorar su actividad antiviral específica, no se había observado previamente y se diferencia básicamente de las composiciones conocidas que contienen inhibidores de transcriptasa inversa.

55 Se sabe que el Meldonio, como un principio activo farmacológico caracterizado por una toxicidad extremadamente baja (más de 25.000 mg/kg, p. o. para ratones), no es ni teratogénico, ni embriotóxico ni carcinógeno y no ejerce prácticamente ninguna influencia adversa en el organismo del ser humano.

60 Los autores de la invención descubrieron que también es una sustancia químicamente muy inerte que puede combinarse en formulaciones incluso con dichas sustancias complicadas y químicamente sensibles como análogos de nucleósidos que incluyen Zidovudina, Lamivudina y Estavudina.

65 Los autores de la invención descubrieron que en la composición terapéutica la proporción de Meldonio con respecto al inhibidor de la transcriptasa inversa puede ser de 1:100 a 100:1. En experimentos con composiciones que contienen, por ejemplo, Zidovudina, Lamivudina o Estavudina y Meldonio se estableció que las proporciones de Meldonio con respecto a Zidovudina, Lamivudina o Estavudina puede variar de 1:5 a 5:1, aunque se prefieren proporciones de 1:2 a 2:1.

Las composiciones farmacéuticas también pueden prepararse basándose en Meldonio y otros inhibidores de la transcriptasa inversa; las composiciones de Meldonio o sus sales farmacéuticas aceptables y Zidovudina, Lamivudina o Estavudina son ejemplos no exhaustivos.

5 En formas de dosificación oral, el contenido de Zidovudina, Lamivudina o Estavudina es de 5-500 mg por comprimido, cápsula, comprimido oblongo u otra forma de dosificación adecuada.

10 Las composiciones terapéuticas que contienen Zidovudina, Lamivudina o Estavudina y Meldonio pueden formarse para introducción oral y parental. En casos particulares, también pueden usarse las formas de introducción transdérmica.

15 Para la introducción oral adecuada, pueden usarse cápsulas, comprimidos, comprimidos oblongos, píldoras, polvos, jarabes y otras formas de dosificación que contienen Zidovudina, Lamivudina o Estavudina y Meldonio y pueden usarse que excipientes farmacéuticamente cómodos además de Zidovudina, Lamivudina o Estavudina y Meldonio. Estas formas terapéuticas pueden prepararse por procedimientos habitualmente conocidos de formas de dosificación oral.

20 La cantidad de Zidovudina, Lamivudina o Estavudina y la dosis diaria recomendada de la composición de Zidovudina, Lamivudina o Estavudina con Meldonio proporcionará un nivel farmacéuticamente suficiente de Zidovudina, Lamivudina o Estavudina en el organismo humano y típicamente constituirá 1- 15 mg/kg para seres humanos, que corresponde a 10-150 mg/kg para ratones. En casos en los que el inhibidor de la transcriptasa inversa de la composición reivindicada sea Zidovudina, Lamivudina o Estavudina, los comprimidos, comprimidos oblongos, cápsulas u otra forma de introducción oral apropiada de composiciones de Zidovudina, Lamivudina o Estavudina y Meldonio normalmente contendrán de 10 a 300 mg de Zidovudina, Lamivudina o Estavudina y 5-1000 mg de Meldonio. Para introducción parenteral, para esta forma de dosificación se recomienda Zidovudina, Lamivudina o Estavudina en concentraciones de 10-20 mg/ml y Meldonio en concentraciones de 50-400 mg/ml.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden formarse basándose en Meldonio y otros inhibidores de la transcriptasa inversa, como ejemplo, pero sin limitación, Zidovudina, Lamivudina o Estavudina, teniendo el inhibidor de la transcriptasa inversa la misma proporción con respecto al Meldonio como en composiciones farmacéuticas de Zidovudina, Lamivudina o Estavudina y Meldonio o sus sales farmacéuticamente aceptables.

La esencia de esta invención se ilustra, pero no se limita, con los siguientes ejemplos.

35 Se estudió la acción cardiotoxica de las composiciones farmacéuticas de Zidovudina y Meldonio introduciéndola en ratones macho de masa inicial  $15,69 \pm 1,56$  g durante dos semanas. Durante el experimento, los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio convencionales a una temperatura de  $22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  y ciclo de 12 horas de luz/oscuridad, alimentándose con pienso para animales de laboratorio convencional. Para el grupo de control (n=6), se introdujeron diariamente por vía intraperitoneal 10 ml de solución acuosa de NaCl al 0,9% (grupo 1 y 12).

40 En una serie de experimentos, se administraron diariamente las siguientes soluciones por vía intraperitoneal para los grupos del ensayo con animales (incluyendo 6 ratones cada uno).

Serie experimental n.º.1:

45 1<sup>er</sup> grupo - Control,

2<sup>o</sup> grupo - Meldonio 100 mg/kg en solución de NaCl al 0,9 %,

50 3<sup>er</sup> grupo - Zidovudina 50 mg/kg en solución de NaCl al 0,9 %,

4<sup>o</sup> grupo - 150 mg/kg de composición farmacéutica que consiste en Zidovudina y Meldonio 1:2 (en masa) disueltos en solución acuosa de NaCl al 0,9 %,

55 5<sup>o</sup> grupo 100 mg/kg de Meldonio en solución de NaCl al 0,9 % y 50 mg/kg de Zidovudina en solución de NaCl al 0,9 %,

Serie experimental n.º.2:

60 6<sup>o</sup> grupo - 50 mg/kg de Estavudina en solución de NaCl al 0,9 %,

7<sup>o</sup> grupo - 50 mg/kg de Lamivudina en solución de NaCl al 0,9 %,

65 8<sup>o</sup> grupo - 150 mg/kg de composición farmacéutica que consiste en Estavudina y Meldonio 1:2 (en masa) disueltos en solución acuosa de NaCl al 0,9 %

9º grupo -150 mg/kg de composición farmacéutica que consiste en Lamivudina y Meldonio 1:2 (en masa) disueltos en solución acuosa de NaCl al 0,9 %,

10º grupo - 100 mg/kg de Meldonio en solución de NaCl al 0,9 %,

11º grupo - 100 mg/kg de Meldonio en solución de NaCl al 0,9 % y 50 mg/kg de Estavudina en solución de NaCl al 0,9 %,

12º grupo - 100 mg/kg de Meldonio en solución de NaCl al 0,9 % y 50 mg/kg de Lamivudina en solución de NaCl al 0,9 %,

13º grupo - control.

El día 15 del ensayo, los animales se decapitaron, se extrajeron los corazones y se pusieron en solución de formalina al 10 %. Para el estudio inmuo-histoquímico, los órganos se fijaron en parafina y se seccionaron preparaciones de 4 µm de grosor que se marcaron de acuerdo con el método inmuo-histoquímico de avidina-biotina usando el kit de reactivos DAKO LSAB. Una vez eliminada la grasa de las preparaciones, estas se fijaron con un reactivo bloqueante de peroxidasa (peróxido de hidrógeno y azida sódica 0,015 mol/l) durante 10 minutos, se aclararon con un tampón isotónico (pH 7,6) y después se incubaron en una cámara de humedad con anticuerpos NF-kBp65 policlonales de conejo (Abcam, Ltd) (1:200) a 4°C durante 12 horas.

Las preparaciones se incubaron con anti-IgG de cabra biotinilada durante 30 min a temperatura ambiente. Después de esto, las secciones se incubaron con Estreptavidina marcada con enzima. Las reacciones de color de inmunoperoxidasa se desarrollaron incubando con diaminobenzidina. En los procedimientos de marcado, como control positivo se usó constantemente parénquima pulmonar (macrófagos alveolares) y como control negativo se usó tejido sin tratamiento previo con anticuerpos primarios. Se realizó un recuento del número de células positivas a NF-kBp65 (tanto en la tinción citoplasmática como nuclear) por el método ciego. Para realizar la valoración cuantitativa, se usó el programa informático de análisis de imágenes Motic Image, Motic e Image ProPlus, Leica, 4000B. El recuento celular se expresó como células por 1 mm<sup>2</sup>. En el corazón, se contaron los núcleos de los cardiomiocitos positivos a NF-kBp65, en campos de alta resolución (x400) y se registró su número total.

Los resultados se expresaron como media ± ETM (error típico de la media). Para el análisis de la fiabilidad estadística se usó el ensayo de la t para muestras independientes (Mann Whitney U test) a un nivel de confianza de P<0,05.

Se descubrió que, en comparación con el control, la AZT, la Estavudina o la Lamivudina inducen el edema perivascular, la degeneración del tejido adiposo del miocardio y la infiltración de leucocitos, lo que inicia la necrosis de cardiomiocitos. El Meldonio, administrado junto con AZT, Lamivudina o Estavudina y las composiciones farmacéuticas de Meldonio/AZT, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina en una proporción, por ejemplo, de 2:1, disminuyó significativamente el edema perivascular y estromal, impidió la necrosis de cardiomiocitos, la degeneración del tejido adiposo del miocardio y la infiltración de leucocitos.

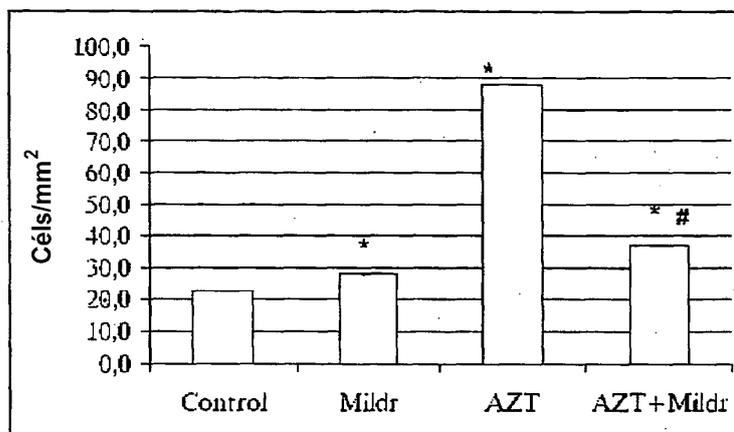


Fig 1. Número total de células positivas a NF-kB en el tejido cardíaco. Leyendas: Control - grupo de control; Mildr - Grupo de Meldonio; AZT - grupo de AZT; AZT + Mildr - grupo de la composición farmacéutica de Meldonio/AZT. La fiabilidad estadística se calcula como \*P<0,05 con respecto al grupo de control; #P<0,05 con respecto al grupo de AZT.

Tabla 1

| Células positivas a NF-kBp65 en tejido cardíaco de ratón, mm <sup>2</sup> |         |          |      |                |
|---|---------|----------|------|----------------|
|   | Control | Meldonio | AZT  | Meldonio y AZT |
| Promedio  | 22,7    | 27,9     | 88,1 | 36,8           |

En la Figura 1 y en la Tabla 1 se muestran los resultados que demuestran que la activación de NF-kBp65 (localizado en el núcleo y en el citosol) total, inducida por AZT es estadísticamente fiable (P<0,05) mientras que la composición farmacéutica de Meldonio/AZT produce básicamente menos daños en el miocardio lo que se demuestra por el hecho de que la actividad de NF-kB se reduce mucho (P<0,05) en el caso de la composición Meldonio/AZT en comparación con el grupo AZT. El mismo resultado se obtuvo con el grupo en el que se administró Meldonio y AZT por separado. Además, cuando se usó el Meldonio y las composiciones medicas propuestas de Meldonio/AZT, la actividad de NF-kBp65 no difirió significativamente de los parámetros de los animales del grupo de control intactos.

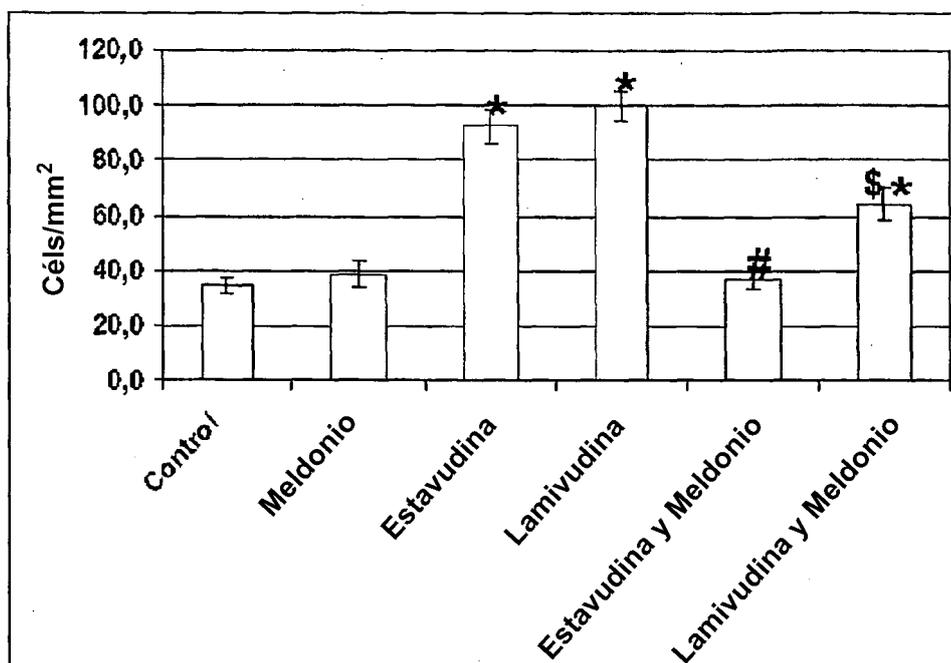


Figura 2. Número total de células positivas a NF-kB en tejido cardíaco. Leyendas: Control – grupo control ; Meldonio – grupo Meldonio; Estavudina – grupo Estavudina; Lamivudina – grupo Lamivudina; Estavudina y Meldonio – grupo de la composición farmacéutica de Estavudina/Meldonio; Lamivudina y Meldonio – grupo de la composición farmacéutica de Lamivudina/Meldonio. La fiabilidad estadística se calcula como \* P<0,05 con respecto al grupo de control; #P<0,05 con respecto al grupo de Estavudina; \$<0,05 con respecto al grupo de Lamivudina.

Tabla 2

| Células positivas a NF-kBp65 en tejido cardíaco de ratón, mm <sup>2</sup> |         |          |            |            |                       |                       |
|---|---------|----------|------------|------------|-----------------------|-----------------------|
|   | Control | Meldonio | Estavudina | Lamivudina | Estavudina y Meldonio | Lamivudina y Meldonio |
| Promedio  | 34,7    | 38,8     | 92,5       | 100,1      | 36,6                  | 64,3                  |

En la Figura 2 y en la Tabla 2 se muestran los resultados que demuestran que la activación de NF-kBp65 (localizado en el núcleo y en el citosol) total inducida por Estavudina y Lamivudina es estadísticamente fiable (P<0,05) mientras que la composición farmacéutica de Meldonio/Estavudina o la composición farmacéutica de Meldonio/Lamivudina produce significativamente menos daños en el miocardio lo que se demuestra por el hecho de que la actividad de NF-kB se reduce sustancialmente en el caso de la composición de Meldonio/Estavudina o en el caso de la composición de Meldonio/Lamivudina en comparación con el grupo de Estavudina y Lamivudina. En los grupos en los que se administró Meldonio y Lamivudina o Estavudina por separado, se obtuvieron los mismos resultados. Además, cuando se usaron las composiciones propuestas, la actividad de NF-kBp65 no difirió significativamente de los parámetros de los animales del grupo de control intactos.

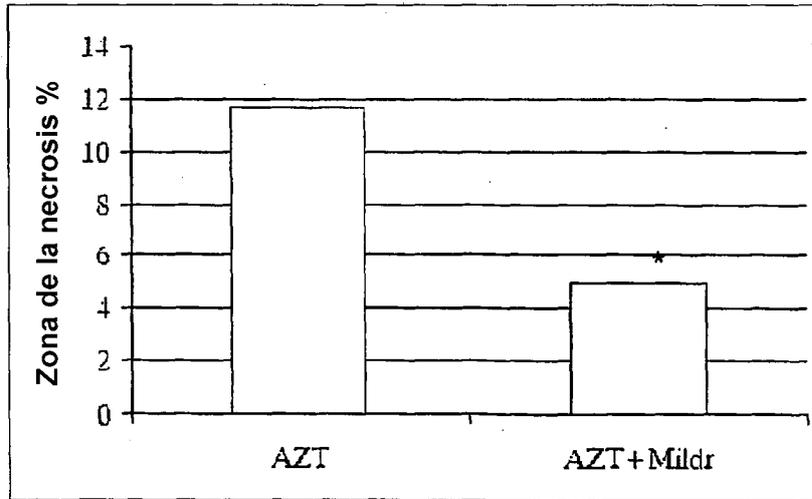


Figura 3. Cardiomiocitos positivos a NF-kB en el tejido del miocardio de ratones. La fiabilidad estadística se calcula como \*P<0,05 con respecto al grupo AZT.

5

Tabla 3

| Zona de necrosis % |      |                |
|--------------------|------|----------------|
|                    | AZT  | AZT y Meldonio |
| Promedio           | 11,7 | 5              |

10

La activación de NF-kBp65 localizado en el núcleo de los cardiomiocitos (Fig. 3 y Tab. 3) solamente se observó en los grupos AZT- y AZT+Meldonio. Concretamente en el caso del uso reivindicado de la composición farmacéutica de Meldonio y AZT, el nivel de actividad de NF-kB fue mucho menor en comparación con los parámetros del grupo AZT (P<0,05). En el grupo en el que se administró Meldonio y AZT por separado, se obtuvo el mismo resultado.

15

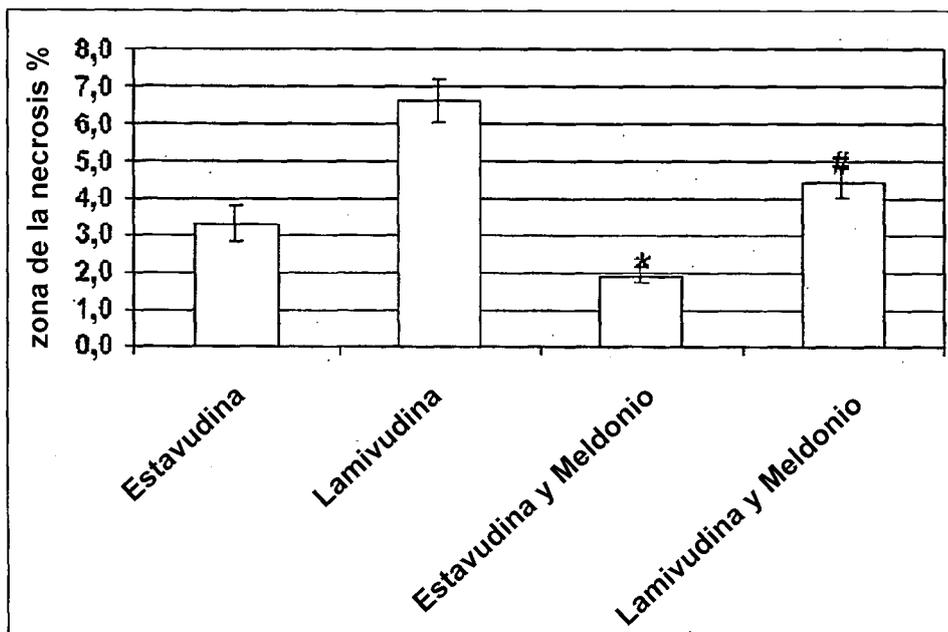


Figura 4. Cardiomiocitos positivos a NF-kB en el tejido de miocardio de ratones. La fiabilidad estadística se calcula como \*P<0,05 con respecto al grupo de Estavudina. La fiabilidad estadística se calcula como #P<0,05 con respecto al grupo de Lamivudina.

20

Tabla 4

| Zona de Necrosis % |            |            |                       |                       |
|--------------------|------------|------------|-----------------------|-----------------------|
|                    | Estavudina | Lamivudina | Estavudina y Meldonio | Lamivudina y Meldonio |
| Promedio           | 3,3        | 6,6        | 2,0                   | 4,4                   |

5 La activación de NF-kBp65 localizado en el núcleo de los cardiomiocitos (Fig. 4 y Tab.4) solamente se observó para las composiciones farmacéuticas de Estavudina y Lamivudina y Meldonio/ Estavudina o Meldonio/Lamivudina. Concretamente en este caso del uso de la composición farmacéutica reivindicada Meldonio/Estavudina y Meldonio/Lamivudina, el nivel de actividad de NF-kB fue mucho menor en comparación con los parámetros de los grupos de Estavudina y Lamivudina (P <0,05). En los grupos en los que se administró Meldonio y AZT por separado, se obtuvo el mismo resultado.

10 La investigación había demostrado que AZT aumenta básicamente tanto el número total de células positivas a NF-kBp65 en el tejido cardiaco como el de NF-kBp65 en los núcleos de los cardiomiocitos. Por el contrario, la administración paralela reivindicada de Meldonio y AZT, Estavudina o Lamivudina y la composición farmacéutica de Meldonio y AZT, Meldonio y Estavudina o la composición farmacéutica de Meldonio y Lamivudina disminuye básicamente tanto el número total de células positivas a NF-kBp65 en los tejidos cardiacos como NF-kBp65 en los núcleos de los cardiomiocitos.

15 También se obtuvieron resultados afirmativos con otras proporciones de Meldonio/AZT, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina en la composición farmacéutica, estableciéndose los mínimos efectos secundarios si las proporciones de Meldonio/AZT, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina eran de 5:1 a 1:2.

20 Dado que la biodisponibilidad del Meldonio es muy alta en la introducción oral, se establecieron efectos tóxicos considerablemente más bajos de las composiciones farmacéuticas de Meldonio/AZT, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina que los de las formas terapéuticas de AZT, Lamivudina o Estavudina tanto en la introducción parenteral como en la enteral.

25 Por lo tanto, los resultados demuestran que la coadministración de Meldonio y AZT, Lamivudina o Estavudina y la administración de composiciones farmacéuticas que contienen Meldonio/AZT, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina son básicamente diferentes de AZT, Lamivudina o Estavudina así como el efecto tóxico en el miocardio y neuronas. La AZT, Lamivudina o Estavudina producen básicamente la degeneración de grasas del miocardio y la activación de NF-kBp65 en los tejidos cardiacos mientras que una dosis análoga de AZT, Lamivudina o Estavudina en una composición farmacéutica con Meldonio o el uso en paralelo no proporciona datos estadísticamente ciertos de la producción de daños en el miocardio.

30 Se realizaron experimentos adicionales para tener la certeza de si aplicando el uso paralelo de Meldonio o la composición de AZT/Meldonio, la composición farmacéutica de Lamivudina/Meldonio o la composición farmacéutica de Estavudina/ Meldonio tenía alguna ventaja en comparación con el uso de AZT, Estavudina, Lamivudina en relación con los efectos neurotóxicos NRTI. Para este propósito, en un experimento de patrón análogo, se evaluaron reacciones neurológicas de animales experimentales después de dos semanas. Para esta evaluación, se realizó el ensayo habitual de periodo de latencia de dolor en el modelo de comprensión de cola, así como la estimación de la transformación degenerativa neuronal del corte cerebral (capas granular externa y molecular).

35 Los experimentos demostraron que AZT, Estavudina o Lamivudina provocan algemia significativa y producen simultáneamente un triple aumento (3 veces) de neuronas degeneradas del córtex cerebral, en comparación con el control. Al mismo tiempo, la coadministración de Meldonio con AZT, Lamivudina o Estavudina o el uso de las composiciones farmacéuticas de AZT/Meldonio, Lamivudina/Meldonio o Estavudina/Meldonio, en comparación con un control intacto, no produjo aumento estadísticamente significativo del número de neuronas degeneradas en el córtex cerebral lo que determina una ventaja esencial de las composiciones reivindicadas en comparación con la utilización de AZT, Estavudina o Lamivudina.

40 Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de AZT/Meldonio, Lamivudina/Meldonio o Estavudina/Meldonio con la coadministración Meldonio, AZT, Lamivudina o Estavudina usada positivamente con Meldonio difieren de AZT, Estavudina o Lamivudina en que la composición reivindicada carece prácticamente carece de influencia tóxica esencial en los tejidos cardiacos o cerebrales si las dosis contienen AZT en una cantidad que, por sí misma, produce daños esenciales en el tejido cardiaco y cerebral y se aplica durante 14 días. Por lo tanto la composición de AZT/Meldonio, Lamivudina/Meldonio o Estavudina/Meldonio o la coadministración de Meldonio con AZT, Lamivudina y Estavudina se caracteriza por un grado de seguridad considerablemente más alto cuando se usan dosis de esta clínicamente pertinentes.

45 La composición farmacéutica de Meldonio/AZT, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina puede formarse para administración oral y parenteral así como para administración tópica.

Para las formas de introducción parenteral, la composición de Meldonio/AZT, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina se realiza como un polvo estéril seco para inyecciones con o sin un excipiente farmacéuticamente adecuado o como soluciones para inyección/infusión I.V. Para formas de solución para inyección, las soluciones de Meldonio y AZT, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina en agua, NaCl al 0,9%, solución acuosa de glucosa de concentración correspondiente o soluciones tampón farmacéuticamente apropiadas son compatibles con sendos principios activos. La concentración de Meldonio en formas de dosificación para inyección puede ser de hasta un 40 %, mientras que la concentración máxima de AZT, Lamivudina o Estavudina depende de la solubilidad de AZT, Lamivudina o Estavudina en el disolvente correspondiente.

Las formas de administración oral (comprimidos con o sin recubrimiento, cápsulas, comprimidos oblongos, grageas, píldoras, gránulos, polvos o soluciones) y similares, de las composiciones farmacéuticas de AZT/Meldonio, Meldonio/Estavudina o Meldonio/Lamivudina se preparan usando procedimientos de preparación de formas terapéuticas orales habituales, seleccionándose los excipientes (aditivos) farmacéuticamente aceptables para que sean químicamente compatibles con AZT, Lamivudina o Estavudina y Meldonio. La cantidad de AZT, Lamivudina o Estavudina en cada dosis de introducción oral, constituye 5-500 mg, preferiblemente 15-40 mg ó 100-300 mg, mientras que la cantidad de Meldonio es 5-4500 mg, más preferiblemente 20-600 mg.

Una posible composición farmacéutica para uso oral, a modo de ejemplo sin limitar la presente invención, es la siguiente formulación de la producción de comprimidos.

|                 | Ejemplo 1 | Ejemplo 2 | Ejemplo 3 | Ejemplo 4 | Ejemplo 5 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| AZT             | 100 mg    | 300 mg    | 300 mg    | 0         | 0         |
| Lamivudina      | 0         | 0         | 0         | 100 mg    | 150 mg    |
| Meldonio        | 250 mg    | 600 mg    | 60 mg     | 200 mg    | 300 mg    |
| Almidón         | 20 mg     | 40 mg     | 20 mg     | 20 mg     | 25 mg     |
| Talco           | 10 mg     | 20 mg     | 10 mg     | 10 mg     | 15 mg     |
| Estearato de Ca | 1 mg      | 2 mg      | 1 mg      | 1 mg      | 1 mg      |

|                 | Ejemplo 6   | Ejemplo 7 | Ejemplo 8  | Ejemplo 9 | Ejemplo 10 |
|-----------------|-------------|-----------|------------|-----------|------------|
| Lamivudina      | 300 mg      | 0         | 0          | 0         | 0          |
| Estavudina      | 0           | 15 mg     | 20 mg      | 30 mg     | 40 mg      |
| Meldonio        | 60 ó 600 mg | 5 ó 30 mg | 4 ó 100 mg | 60 mg     | 80 mg      |
| Almidón         | 20 mg       | 20 mg     | 20 mg      | 20 mg     | 20 mg      |
| Talco           | 10 mg       | 10 mg     | 10 mg      | 10 mg     | 10 mg      |
| Estearato de Ca | 1 mg        | 1 mg      | 1 mg       | 1 mg      | 1 mg       |

Una posible composición farmacéutica para uso oral, a modo de ejemplo sin limitar la presente invención, es la siguiente formulación de preparación de cápsulas:

|                 | Ejemplo 11  | Ejemplo 12  | Ejemplo 13 | Ejemplo 14    | Ejemplo 15     |
|-----------------|-------------|-------------|------------|---------------|----------------|
| AZT             | 100 mg      | 0           | 0          | 0             | 0              |
| Lamivudina      | 0           | 100 mg      | 0          | 0             | 0              |
| Estavudina      | 0           | 0           | 15 ó 20 mg | 30 mg         | 40 mg          |
| Meldonio        | 200 ó 250mg | 200 ó 250mg | 30 ó 40 mg | 5, 15 ó 60 mg | 20, 40 u 80 mg |
| aerosil         | 5 mg        | 5 mg        | 5 mg       | 5 mg          | 5 mg           |
| lactosa         | 66 mg       | 66 mg       | 66 mg      | 66 mg         | 66 mg          |
| talco           | 7 mg        | 7 mg        | 7 mg       | 7 mg          | 7 mg           |
| Estearato de Ca | 3 mg        | 3 mg        | 3 mg       | 3 mg          | 3 mg           |

Una posible composición farmacéutica para uso oral, a modo de ejemplo sin limitar la presente invención, es la siguiente formulación de preparación de solución y/o jarabe:

|                          | Ejemplo 16         | Ejemplo 17         | Ejemplo 18           |
|--------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| AZT                      | 10 mg/ml           | 20 mg/ml           | 50 mg/ml             |
| Meldonio                 | 5 mg/ml ó 20 mg/ml | 5 mg/ml ó 40 mg/ml | 10 mg/ml ó 100 mg/ml |
| Metil-p-hidroxibenzoato  | 0,20-0,60 g        | 0,20-0,60 g        | 0,20-0,60 g          |
| Propil-p-hidroxibenzoato | 0,01-0,1 g         | 0,01-0,1 g         | 0,01-0,1 g           |
| Propilenglicol           | 6,15-8,30 g        | 6,15-8,30 g        | 6,15-8,30 g          |
| Sorbit                   | 120,00-150,50 g    | 120,00-150,50 g    | 120,00-150,50 g      |
| Glicerina                | 10,00-15,00 g      | 10,00-15,00 g      | 10,00-15,00 g        |
| Agua purificada          | 150 ml             | 150 ml             | 150 ml               |

|                                       | Ejemplo 19          | Ejemplo 20                   |
|---------------------------------------|---------------------|------------------------------|
| Inhibidor de la transcriptasa inversa | Lamivudina 10 mg/ml | Estavudina 1 mg/mL           |
| Meldonio                              | 5 mg/ml ó 20 mg/ml  | 1 mg/ml ó 5 mg/ml ó 40 mg/ml |
| Metil-p-hidroxibenzoato               | 0,20-0,60 g         | 0,20-0,60 g                  |
| Propil-p-hidroxibenzoato              | 0,01-0,1 g          | 0,01-0,1 g                   |
| Propilenglicol                        | 6,15-8,30 g         | 6,15-8,30 g                  |
| Sorbit                                | 120,00-150,50 g     | 120,00-150,50 g              |
| Glicerina                             | 10,00-15,00 g       | 10,00-15,00 g                |
| Agua purificada                       | 150 ml              | 150 ml                       |

### Aplicabilidad Industrial

15

Las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de infecciones retrovirales que contienen uno de los inhibidores de la transcriptasa inversa, concretamente, Zidovudina, Lamivudina, Estavudina en cantidades clínicamente eficaces y Meldonio o sus sales farmacológicamente aceptables así como excipientes farmacéuticamente aceptables pueden prepararse en una fábrica farmacéutica convencional.

20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad clínicamente eficaz de inhibidor de la transcriptasa inversa y de Meldonio o de su sal farmacéuticamente aceptable, así como de excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el inhibidor de la transcriptasa inversa se selecciona del grupo que consiste de Zidovudina (AZT) (químicamente: 3'-azido-3'-desoxitimidina), Lamivudina (químicamente: (2R-cis) -4 - amino-1-[2 - (hidroximetil) -1,3-oxatiolan-5-il] -2 (1H)-pirimidinona) y Estavudina (químicamente: 2', 3'-didehidro-3'-desoxitimidina).
- 15 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 que contiene Meldonio y/o una sal (sales) del mismo en tal cantidad que la proporción en masa de Meldonio/sal (o sales) con respecto al inhibidor de la transcriptasa inversa es de 5:1 a 1:5, más preferiblemente de 2:1 a 1:2.
- 20 4. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que se caracteriza por su disposición para la introducción oral o sublingual en forma de un comprimido (con o sin recubrimiento), cápsula, comprimido oblongo, gragea, píldora, polvo, o una solución que contiene de 0,1 a 5,0 g de activos de acuerdo con el peso de cada dosis de comprimido, cápsula, gragea, píldora o polvo, o esta es una solución o un jarabe al 0,5-40 % para la administración oral.
- 25 5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 que se caracteriza por su disposición para la introducción parenteral y por ser un polvo estéril que contiene 0,1-5,0 g de activos en cada dosis para la introducción parenteral.
- 30 6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2 que se caracteriza por su disposición de la introducción parenteral y por ser una solución para inyección que contiene 10-20 mg /ml del inhibidor de la transcriptasa inversa y 500 - 400 mg /ml de Meldonio y/o sal (o sales) del mismo.
- 35 7. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que Meldonio y/o su sal se usa en forma de una solución de NaCl al 0,9 %.
- 40 8. El uso de Meldonio o de su sal farmacológicamente aceptable para la preparación de un medicamento para reducir o eliminar las reacciones secundarias adversas, en particular, para disminuir o evitar daños mitocondriales, especialmente para disminuir o evitar una cardio- y / o neuro-toxicidad producida por los inhibidores de la transcriptasa inversa en composiciones farmacéuticas.
- 45 9. El uso acuerdo con la reivindicación 8, en la que el Meldonio y/o su sal se administra mezclado con uno o más inhibidores de la transcriptasa inversa o por separado simultáneamente o inmediatamente antes o inmediatamente después de la administración del inhibidor (o inhibidores) de la transcriptasa inversa, preferiblemente en forma de una solución de NaCl al 0,9 %.
10. El uso de la reivindicación 8 ó 9, en la que la administración se realiza por vía oral, parenteral o tópica.
11. El uso de la reivindicación 8 ó 9 o 10, en la que el Meldonio y/o una sal del mismo se administra en una cantidad clínicamente eficaz.