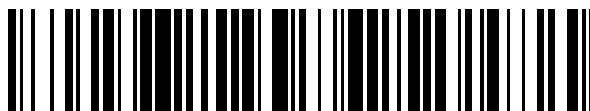


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 414**

51 Int. Cl.:
A61K 31/454 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)
A61K 31/13 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08732015 .6**
96 Fecha de presentación: **12.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2142192**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.01.2010**

54 Título: **Composiciones y kits para el tratamiento de la gripe**

30 Prioridad:
13.03.2007 US 918011 P
05.10.2007 US 978099 P
21.11.2007 US 989790 P
29.02.2008 US 40856

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.04.2012

73 Titular/es:
Adamas Pharmaceuticals, Inc.
2200 Powell Street, Suite 200
Emeryville, CA 94608, US

72 Inventor/es:
NGUYEN, Jack;
WENT, Gregory T.;
SPENCE, Paul;
FULTZ, Timothy J.;
CHERNOFF, David;
BURKOTH, Terry L.;
CHAPMAN, Rowan y
URDEA, Mickey S.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 379 414 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

Composiciones y kits para el tratamiento de la gripe

Antecedentes de la invención

5 El campo de la invención se refiere a las combinaciones antivirales y a su uso para el tratamiento o profilaxis de la gripe en un paciente.

10 Actualmente, la FDA ha aprobado cuatro fármacos antivirales para tratar la gripe aguda sin complicaciones. Los inhibidores de M2 clorhidrato de amantadina (SYMMETREL®) y rimantadina (FLUMADINE®) están aprobados para el tratamiento y la prevención de la gripe A. Tanto amantadina como rimantadina se proporcionan en comprimidos de 100 mg y 50 mg/ml de jarabe para administración oral. La dosis habitual para adultos de ambos fármacos es 200 mg en dos dosis divididas al día (BID). La dosis pediátrica de amantadina en pacientes de 1-9 años de edad es de 4,4 a 8,8 mg/kg/día, sin superar los 150 mg al día; para rimantadina, la dosis es de 5 mg/kg administrados una vez al día (QD) sin superar los 150 mg al día.

15 Los inhibidores de la neuraminidasa zanamivir (RELENZA®) y oseltamivir fosfato (TAMIFLU®) están aprobados para el tratamiento y la prevención de la gripe A y B. Zanamivir se proporciona únicamente para inhalación oral para su uso con un dispositivo de inhalación. La dosis recomendada de zanamivir para profilaxis y tratamiento de la gripe es de 10 mg/día QD y de 20 mg/día BID, respectivamente. Oseltamivir fosfato está disponible como una cápsula que contiene 75 mg de oseltamivir para uso oral y en polvo para suspensión oral que, cuando se constituye con agua tal como está indicado, contiene 12 mg/ml de oseltamivir. La dosis recomendada de zanamivir para profilaxis y tratamiento de la gripe es de 75 mg/día QD y de 150 mg/día BID, respectivamente.

20 Se han propuesto varias combinaciones de fármacos antivirales para el tratamiento de la gripe. La patente de EE.UU. Nº 5,866,601 divulga combinar composiciones del inhibidor de la neuraminidasa con antivirales (tales como amantadina, rimantadina y ribavirina). Se han notificado estudios realizados con modelos animales in Vitro e in vivo sobre el efecto de varias combinaciones dobles de fármacos contra la gripe (véase, por ejemplo, incluidas combinaciones de ribavirina con amantadina (Wilson y col., Antimicrob Agents Chemother (1980) 17:642 - 648; Hayden y col., Antimicrob Agents Chemother (1980) 18:536 - 41; y Burlington y col., J. Antimicrob Chemother (1983) 11:7 - 14), rimantadina (Hayden y col., Sutra; Galegov et al., Experientia (1977) 33:905 - 906; y Madren y col., Antivir Chem Chemother (1995) 6:109 - 113), peramavir (Smee y col., Chemotherapy (2002) 48:88 - 93), y oseltamivir (Smee y col., Antiviral Chem Chemother (2006) 17:185 - 92); y combinaciones de oseltamivir con amantadina (Ilyushina y col., Antiviral Res. (2006) 70:121 - 31) y rimantadina (Govorkova y col., Antimicrob Agents Chemother (2004) 48:4855 - 4863; Galabov y col., Antivir Chem Chemother (2006) 17:251 - 8; y Leneva y col., Antiviral Res (2000) 48:101 - 15). En varios de estos artículos se ha notificado que combinaciones de ribavirina y amantadina se añaden al efecto sinérgico contra el virus de la gripe en comparación con el tratamiento con los fármacos por separado (véase, por ejemplo, Wilson y col., supra; Hayden y col., supra; y Burlington y col., supra). En algunos de los estudios, se ha notificado que los tratamientos de combinación tienen resultados adversos en comparación con los tratamientos en monoterapia. Por ejemplo, se ha notificado que la combinación de oseltamivir y rimantadina a concentraciones bajas de cada fármaco tiene como resultado una interacción antagonística contra el virus de la gripe A (Govorkova y col., supra). Smee y col. (2006) notificaron que el tratamiento de ratones infectados por el virus de la gripe A con la combinación de oseltamivir más ribavirina no era mejor que la ribavirina usada sola y que cuando los tratamientos se iniciaban de tres a cuatro días después de la infección, los grupos tratados con la combinación tenían menos supervivientes que los animales tratados con ribavirina sola.

45 La resistencia viral a los inhibidores de M2 rimantadina y amantadina puede emerger rápidamente durante el tratamiento porque ciertas mutaciones puntuales sencillas en la proteína M2 puede conferir resistencia tanto a amantadina como a rimantadina. En enero de 2006, las pruebas del CDC revelaron que una elevada proporción de virus de la gripe A circulantes en EE.UU. eran resistentes a amantadina y rimantadina, lo que hace que los CDC recomendaran en contra del uso de estos fármacos para el tratamiento y la profilaxis de la gripe (Alerta sanitaria de los CDC, 14 de enero de 2006). En la actualidad, oseltamivir se considera un tratamiento frontal para el virus de la gripe A. No obstante, se han notificado cepas resistentes a oseltamivir (de Jong y col., N Engl J Med. (2005) 353:2667 - 72; Euro Surveill. (2005)10(10):E051020.2) que plantean los problemas de que las cepas patógenas resistentes transmisibles podrían reducir los beneficios del uso antiviral en el control de pandemias (Lipsitch y col., PLoS Med (2007) Jan 23;4(1):e15 [publicación electrónica previa a la impresión]). Además, el tratamiento con oseltamivir se ha vinculado con acontecimientos neuropsiquiátricos graves, especialmente en pacientes pediátricos (véase Prescrire Int. (2006) 15:182 - 3).

55 D2 (Hayden, F. G. J. Antimicrob. Chemother. 18, Suppl. B, 177 - 183 (1986)) trata cómo "la justificación para la investigación sobre el uso de combinaciones de fármacos en infecciones virales incluye la identificación de combinación farmacológica que permite la reducción de las dosis individuales de cada fármaco y la posible toxicidad del fármaco relacionada con la dosis, la potenciación de la actividad antiviral en infecciones por virus menos sensibles y la prevención de la aparición de resistencias a fármacos".

En D3 (Govorkova, E. A. y col., Antimicrob. Agents Chemother. 4855 - 4863 (2004)) los autores han "analizado las combinaciones que combinaron un inhibidor de neuraminidasa (NA) (zanamivir, oseltamivir carboxilato o peramivir) con rimantadina contra la infección de células MDCK con los subtipos H1N1 y H3N2 del virus de la gripe A y han caracterizado su modo de interacción".

5 En D4 (Nineteenth ICAR Abstracts Antiviral. Res. 70, A29 (2006)) se tratan las "ventajas de la quimioterapia de combinación para virus de la gripe A/Vietnam/1203/04 (H5n1) altamente patogénicos en ratones".

En D5 (Ilyushina, N. A. y col., Antivir. Res. 70 121 - 131 (2006)) los autores "observaron que las cantidades víricas de los virus A/Nanchang/1/99 (H1N1), A/Panama/2007/99 (H3N2) y A/Hong Kong/156/97 (H5N1) humanos en células MDCK se redujeron significativamente ($P < 0,005$) cuando las células se trataron con la combinación de amantadina y dosis bajas de oseltamivir carboxilato ($\leq 1 \mu\text{M}$)".

10

En D6 (Madren, L. K. y col., Antivir. Chem. Chemother. 6, 109 - 113 (1995)) "se sometieron a ensayo combinaciones dobles de rimantadina, ribavirina, 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina (2-FDG) y 4-guanidino-Neu5Ac2en (GG167) frente a aislamientos clínicos de los virus de la gripe A, subtipos H3N2 y H1N1 en células MDCK mediante ELISA. Cada una de las combinaciones dobles mostraron efectos aditivos, excepto por la combinación de 2-FDG y ribavirina que fue sinérgico contra el virus de la gripe A (H1N1)."

15

D7 (De Clercq, E. y Neyts, J., Trends Pharmacol. Sci. 28, 280 - 285 (2007)) trata "dianas y estrategias para intervención quimioterapéutica" en el caso de la gripe A aviar (H5N1).

En vista de lo anterior, un objeto de la invención es proporcionar mejores terapéuticas para el tratamiento o profilaxis de la gripe, en particular la gripe pandémica y/o cepas de la gripe que son resistentes a un inhibidor de M2 y/o un inhibidor de neuraminidasa.

20

Otro objeto de la invención es proporcionar mejores terapéuticas para el tratamiento o profilaxis de la gripe que evitan la generación de cepas resistentes a fármacos en un paciente o población.

Otro objeto de la invención es proporcionar mejores terapéuticas para el tratamiento o profilaxis de la gripe que tienen significativamente menos acontecimientos adversos o ninguno o efectos tóxicos en comparación con las monoterapias actuales.

25

Sumario de la invención

Un aspecto de la invención es una composición que comprende: 10 - 60 por ciento en peso (% p), amantadina; y 30-80 % en peso de ribavirina, en la que los porcentajes en peso se basan en el peso total de los agentes activos en la composición. La composición además comprende 0,5-30 % en peso de oseltamivir.

30 En una realización, la composición está en una formulación adecuada para administración oral o gástrica, tal como un líquido, jarabe, suspensión, comprimido, cápsula, perlas en cápsulas o perlas en sobres. En una realización específica, la composición está en una forma de dosificación unitaria para administración oral que comprende 25-125 mg de amantadina y 50-200 mg de ribavirina. En una realización específica, la forma de dosificación unitaria comprende al menos 125 mg de amantadina en una forma de liberación extendida y menos de 200 mg de ribavirina.

35 En otra realización, la forma de dosificación unitaria comprende 25 - 125 mg de amantadina y 50-200 mg de ribavirina.

En otra realización, la composición está en una forma adecuada para administración parenteral, tal como un polvo liofilizado, que se reconstituye antes de la administración, o un líquido estéril en un vial.

40 Otro aspecto de la invención es un kit para el tratamiento o profilaxis de la gripe en un paciente que comprende amantadina, ribavirina y oseltamivir.

En una realización específica, se proporciona un kit para el tratamiento o profilaxis oral de la gripe en un paciente, que comprende una pluralidad de formas de dosificación, constituyendo dicha pluralidad una o más dosis, comprendiendo cada dosis una cantidad terapéutica o profiláctica eficaz de una combinación de ribavirina y amantadina. La ribavirina y la amantadina se pueden formular como formas de dosificación separadas o co-formular como formas redosificación por separado. La amantadina puede estar en una forma de liberación extendida. En una realización específica, la amantadina y la ribavirina se formulan como formas de dosificación separadas, comprendiendo cada forma de dosificación de amantadina 75-250 mg de amantadina y comprendiendo cada dosis de ribavirina 50-200 o 100-400 mg de ribavirina. En varias realizaciones, el kit comprende una forma de dosificación de amantadina a una concentración de dosis seleccionada de 80 mg, 180 mg, y 330 mg, y una forma de dosificación de ribavirina a una concentración de dosis seleccionada del grupo que consiste en 115mg, 330 mg y 660 mg. En una realización, cada dosis comprende además oseltamivir

45

50

En otra realización, se proporciona el kit para tratamiento parenteral de la gripe en un paciente humano, que comprende amantadina en una forma adecuada para administración oral; y ribavirina en una forma adecuada para administración parenteral. La amantadina puede estar contenida en una pluralidad de primeros viales y la ribavirina

contenida en una pluralidad de segundos viales. Como alternativa, la amantadina y la ribavirina se formulan conjuntamente y están contenidas en una pluralidad de viales. El kit puede además comprender oseltamivir en una forma adecuada para administración parenteral.

5 Otro aspecto de la invención es un agente antiviral o combinación de agentes antivirales para su uso en un procedimiento para el tratamiento o profilaxis de la gripe en un paciente, en el que dicho procedimiento comprende: Administrar al paciente una cantidad eficaz de una combinación de tres agentes antivirales diferentes que tienen los correspondientes tres mecanismos de acción diferentes, amantadina, ribavirina u oseltamivir.

10 En una realización preferida, los agentes antivirales primero y segundo se administran en cantidades que multiplican la sensibilidad de un virus de la gripe al tercer agente antiviral por al menos 2 sobre la sensibilidad del virus al tercer agente antiviral cuando se usa como monoterapia. En una realización específica de este tipo, el primero y el segundo agente antiviral son ribavirina y oseltamivir, y el tercer agente antiviral es amantadina.

En una realización del procedimiento, los agentes antivirales se administran al paciente mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en combinaciones orales, parenterales o por inhalación de los mismos.

15 En una realización específica, se administra al paciente amantadina en una cantidad para mantener una concentración en plasma entre 0,1 a 3,0 µg/ml, 0,1 a 1,5 µg/ml o de 0,2 a 1,5 µg/ml durante al menos 48 horas seguidas.

En otra realización, se administra al paciente amantadina por vía parenteral u oral en una cantidad de 5 a 500 mg/día, de 20 a 250 mg/día, de 100 a 800 mg/día, de 100 a 600 mg/día, de 200 a 700 mg/día o de 200 a 500 mg/día. Cuando se administra por vía oral, la amantadina está opcionalmente en una forma de liberación extendida.

20 En una realización adicional, se administra al paciente amantadina mediante infusión intravenosa a una velocidad de 1 a 50 mg/h, de 3 a 40 mg/h o de 5 a 30 mg/h durante al menos 48 horas seguidas.

25 En una realización, se administra al paciente ribavirina en una cantidad para mantener una concentración plasmática entre 0,1 a 10,0 µg/ml, de 0,5 a 8 µg/ml, de 0,5 a 5,0 µg/ml, de 1 a 6 µg/ml, de 1 a 4 µg/ml, de 2 a 6 µg/ml, de 2 a 4 µg/ml, de 0,01 a 2 µg/ml, o de 0,2 a 2 µg/ml durante al menos 48 horas seguidas. En otra realización, se administra al paciente amantadina por vía parenteral u oral en una cantidad de 5 a 500 mg/día, de 20 a 1.600 mg/día, de 100 a 800 mg/día, de 100 a 600 mg/día, de 200 a 700 mg/día o de 200 a 200 mg/día.

En una realización específica, se administra al paciente ribavirina mediante infusión intravenosa a una velocidad de 5 a 200 mg/h, de 10 a 150 mg/h, de 15 a 100 mg/h o de 20 a 80 mg/h durante al menos 48 horas seguidas.

30 En una realización específica, en la que se administra al paciente amantadina en una de las cantidades especificadas anteriormente junto con ribavirina en una de las cantidades especificadas anteriormente, también se administra al paciente oseltamivir en una cantidad para mantener una concentración plasmática del inhibidor de la neuraminidasa entre 0,001-5 µg/ml, de 0,02 a 5 µg/ml, de 0,1 a 3 µg/ml, de 0,1 a 1 µg/ml, de 0,3 a 3 µg/ml, o de 0,3 a 1 µg/ml durante al menos 48 horas seguidas.

35 En un ejemplo comparativo, se administra al paciente zanamivir mediante infusión intravenosa a una velocidad de 0,1 a 10 mg/h, de 0,4 a 7 mg/h o de 1 a 5 mg/h durante al menos 48 horas seguidas.

En otra realización se administra al paciente oseltamivir mediante infusión intravenosa a una velocidad de 0,1 a 20 mg/h, de 0,4 a 7 mg/h, de 1 a 7 mg/h, de 1 a 5 mg/h o de 2 a 7 mg/h durante al menos 48 horas seguidas.

40 En varias realizaciones, se puede administrar al paciente oseltamivir por vía parenteral u oral en una cantidad de 10 a 150 mg/día, de 10 a 50 mg/día, de 50 a 100 mg/día, de 75 a 150 mg/día, de 150 a 300 mg/día o de 100 a 500 mg/día o de 1 a 50 mg/día.

45 La presente divulgación describe un primer agente antiviral, un segundo agente antiviral y un tercer agente antiviral para la administración simultánea por separado o secuencia, en la que los tres agentes tienen tres correspondientes mecanismos de acción seleccionados del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

50 La presente divulgación también describe un primer agente antiviral, un segundo agente antiviral y un tercer agente antiviral para uso combinado en terapia, en el que los tres agentes antivirales tienen tres correspondientes mecanismos de acción seleccionados del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

La presente divulgación también describe un primer agente antiviral, un segundo agente antiviral y un tercer agente antiviral para uso combinado en el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que los tres agentes antivirales tienen tres correspondientes mecanismos de acción seleccionados del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN

polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

5 La presente divulgación también describe el uso de un primer agente antiviral, un segundo agente antiviral y un tercer agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que los tres agentes antivirales tienen tres correspondientes mecanismos de acción seleccionados del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa. Más adelante también se describe que los tres agentes se pueden administrar por separado o en combinaciones dobles o triples.

10 La presente divulgación también describe el uso de un agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de la adsorción del virus de la gripe, inhibidores de M2, inhibidores de la IMP deshidrogenasa, inhibidores de la ARN polimerasa, oligonucleótidos de interferencia específicos de la gripe e inhibidores de la neuraminidasa, y en el que el medicamento se prepara para administración (o se administra) a un paciente en combinación con dos agentes antivirales adicionales, en el que los tres agentes antivirales tienen diferentes mecanismos de acción y se seleccionan del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

15 La presente divulgación también describe el uso de un primer agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el medicamento se prepara para administración (o se administra) a un paciente en combinación con un segundo agente antiviral y un tercer agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa, y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

20 La presente divulgación también describe el uso de un segundo agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el medicamento se prepara para administración (o se administra) a un paciente en combinación con un primer agente antiviral y un tercer agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

25 La presente divulgación también describe el uso de un tercer agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el medicamento se prepara para administración (o se administra) a un paciente en combinación con un segundo agente antiviral y un tercer agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

30 La presente divulgación también describe el uso de un primero y un segundo agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el medicamento se prepara para administración (o se administra) a un paciente en combinación con un tercer agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

35 La presente divulgación también describe el uso de uno o más agente(s) antiviral(es) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que los agentes antivirales tienen diferentes mecanismos de acción seleccionados del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa; y en el que el medicamento se prepara para administración (o se administra) a un paciente en combinación con uno o más agentes antivirales adicionales de modo que el paciente recibe tres agentes antivirales que tienen diferentes mecanismos de acción seleccionados de dicho grupo.

40 La presente divulgación también describe el uso de un agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe en un paciente, en el que el agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de la adsorción del virus de la gripe, inhibidores de M2, inhibidores de la IMP deshidrogenasa, inhibidores de la ARN polimerasa, oligonucleótidos de interferencia específicos de la gripe e inhibidores de la neuraminidasa, y en el que el paciente ha sido tratado previamente con al menos dos agentes antivirales adicionales, en el que dichos agentes antivirales tienen diferentes mecanismos de acción,

seleccionándose dichos diferentes mecanismos de acción del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

5 La presente divulgación también describe el uso de un primer agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe en un paciente, en el que el paciente ha sido tratado previamente con segundo agente antiviral y, opcionalmente, con un tercer agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

10 La presente divulgación también describe el uso de un segundo agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe en un paciente, en el que el paciente ha sido tratado previamente con primer agente antiviral y, opcionalmente, con un tercer agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

15 La presente divulgación también describe el uso de un tercer agente antiviral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe en un paciente, en el que el paciente ha sido tratado previamente con primer agente antiviral y, opcionalmente, con un segundo agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

20 En estos usos, el tratamiento anterior del paciente normalmente no se habrá realizado más de 7 días antes de la administración de dicho medicamento (p. ej., en los 7, 6, 5, 4, 3, 2 días anteriores o en las 24 horas previas).

25 La presente divulgación también describe un agente antiviral para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidores de la adsorción del virus de la gripe, inhibidores de M2, inhibidores de la IMP deshidrogenasa, inhibidores de la ARN polimerasa, oligonucleótidos de interferencia específicos de la gripe e inhibidores de la neuraminidasa, y en el que el agente antiviral se administra (o se prepara para administración) con al menos un agente antiviral adicional, en el que dichos agentes antivirales tienen diferentes mecanismos de acción, seleccionándose dicho mecanismo de acción diferente del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

30 La presente divulgación también describe un primer agente antiviral para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el primer agente antiviral se administra (o se prepara para administración) con un segundo agente antiviral y, opcionalmente, un tercer agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

35 La presente divulgación también describe un segundo agente antiviral para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el segundo agente antiviral se administra (o se prepara para administración) con un primer agente antiviral y, opcionalmente, un tercer agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

40 La presente divulgación también describe un tercer agente antiviral para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe, en el que el tercer agente antiviral se administra (o se prepara para administración) con un primer agente antiviral y, opcionalmente, un segundo agente antiviral, en el que: a) el primer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, e inhibidor de M2; b) el segundo agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en inhibidor de la IMP deshidrogenasa e inhibidor de la ARN polimerasa; y c) el tercer agente antiviral se selecciona del grupo que consiste en oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa.

45 La invención también proporciona amantadina, ribavirina y oseltamivir para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe.

La invención también proporciona amantadina para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe, que comprende administrar amantadina, ribavirina y oseltamivir.

La invención también proporciona ribavirina para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe, que comprende administrar amantadina, ribavirina y oseltamivir.

- 5 La invención también proporciona oseltamivir para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe, que comprende administrar amantadina, ribavirina y oseltamivir.

La invención también proporciona amantadina y ribavirina para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe, que comprende administrar amantadina, ribavirina y oseltamivir.

Breve descripción de las figuras

- 10 Las FIGS. 1A - 4 son vistas en planta de respectivos seis paquetes blister diferentes que comprenden formas de dosificación de acuerdo con diferentes realizaciones de la presente invención

La FIG. 5 es un gráfico del volumen de sinergia de los datos generados del experimento descrito en el ejemplo 1B.

Descripción detallada de la invención

- 15 La invención proporciona usos, composiciones y kit para el tratamiento de un paciente humano que tenga una infección por el virus de la gripe o que se sospecha que está infectado por él o presenta riesgo de exposición al virus de la gripe. La invención se puede usar para prevenir o reducir la probabilidad de la generación de cepas resistentes a fármacos, para tratar a un paciente humano que se sospecha que está infectado por o en riesgo de exposición a un virus de la gripe resistente a fármacos y para minimizar los efectos secundarios y la toxicidad asociados con la monoterapia.

- 20 Un aspecto de la invención es un agente antiviral para su uso en un procedimiento para el tratamiento o profilaxis de la gripe en un paciente para reducir o prevenir los síntomas asociados con la infección por el virus de la gripe. El paciente puede ser un ser humano o cualquier otro animal susceptible de sufrir una infección por gripe (p. ej., animales domésticos, tales como gatos y perros; ganado y animales de granja, tales como caballos, vacas, cerdos, pollos, etc.). Se usan patrones de atención médica para determinar que un paciente es probable que esté infectado por el virus de la gripe o está en riesgo de exposición al virus de la gripe. El virus de la gripe puede ser un virus A o B. En realizaciones específicas, el virus es un virus de la gripe A (p. ej., H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H9N2, etc.).

- 30 El procedimiento comprende administrar al paciente una combinación de tres agentes antivirales diferentes (en lo sucesivo se denomina una "combinación triple") que tiene los correspondientes tres mecanismos de acción seleccionados del grupo que consiste en inhibidor de la adsorción del virus de la gripe, inhibidor de M2, inhibidor de la IMP deshidrogenasa, inhibidor de la ARN polimerasa, oligonucleótido de interferencia específico de la gripe e inhibidor de la neuraminidasa. Los tres agentes antivirales diferentes son amantadina, ribavirina y oseltamivir. A la combinación triple se pueden añadir uno o más agentes antivirales adicionales (p. ej., un cuarto agente antiviral que tenga un mecanismo de acción que difiera de los tres mecanismos de la combinación triple o que es el mismo que uno de los mecanismos de la combinación triple). Con las referencias en el presente documento a agentes antivirales específicos (p. ej., amantadina, oseltamivir etc.) se pretende incluir sales farmacéuticamente aceptables de los agentes antivirales (p. ej., amantadina, clorhidrato, oseltamivir fosfato etc.).

- 40 Los agentes antivirales se administran, preferentemente, a proporciones y dosis relativas que se ha demostrado que son aditivas o sinérgicas con respecto a una reducción de la carga viral, los síntomas, la duración de la enfermedad, la prevención de cepas resistentes a fármacos etc. Sinergia es cuando la eficacia de la combinación es mayor que la eficacia acumulada de cada fármaco dentro de la combinación como agentes únicos (Prichard y Shipman, *Antiviral Res.* (1990) 14:181 - 206). Procedimientos para medir la sinergia farmacológica de los agentes antivirales se describen en los Ejemplos siguientes y, en general, son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Schinazi y col., *Antimicrob Agents Chemother.* (1982) 22:499 - 507; y Prichard y Shipman, *supra*; y Prichard y col., *Antimicrob Agents Chemother* (1993) 37:540 - 545; cada uno incorporados en el presente documento por referencia). La Figura 5 representa un gráfico de sinergia tridimensional de datos obtenidos del experimento descrito en el Ejemplo 1B más adelante; el análisis se realizó usando procedimientos descritos por Prichard y col. (1993), *supra*.

- 50 El uso de cantidades sinérgicas de los agentes antivirales proporciona mayor eficacia y/o permite menores cantidades de uno o más de los fármacos que se van a usar que los usados en la monoterapia actual, de modo que tiene como resultado menores efectos secundarios para el paciente y permite la producción de más dosis de tratamiento desde una cantidad finita del fármaco a granel. En una realización específica, la combinación multiplica la sensibilidad de una o más cepas de un virus de la gripe a al menos uno de los agentes antivirales por al menos 2, 5, 10, 20, 50 o 100 en comparación con la sensibilidad del virus al fármaco cuando se usa como monoterapia. Por ejemplo, cuando un fármaco tiene una CE_{50} de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ contra un virus de la gripe cuando se usa como monoterapia determinada mediante ensayos *in vitro* y tiene una CE_{50} de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ o menor cuando se usa en combinación con otros dos agentes antivirales, se dice que la combinación multiplica la sensibilidad del virus de la

gripe al fármaco por al menos 100. Preferentemente, la sensibilidad de dos o los tres fármacos en la combinación mejora al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces o 100 veces. El Ejemplo 1B que figura a continuación describe un ensayo *in vitro* para determinar como se pueden determinar los incrementos en la sensibilidad al fármaco usando una cepa de la gripe H3N2. Se puede usar el mismo ensayo para medir la sensibilidad al fármaco frente a otras cepas de la gripe. En ausencia de sinergia, las combinaciones de antivirales pueden seguir siendo beneficiosas debido a la contribución aditiva de cada fármaco en la combinación y la eficacia global de la combinación sin toxicidad añadida.

El uso de la combinación triple reduce significativamente la probabilidad de la generación de cepas resistentes a fármacos en comparación con las monoterapias previas. Esto es particularmente ventajosa en el tratamiento de la gripe en una pandemia o brote localizado. Además, la combinación triple se puede usar para tratar a un paciente humano infectado con el virus de la gripe resistente a un fármaco o en riesgo de exposición al mismo. Dado que normalmente los médicos no disponen de un genotipado viral rápido en tiempo real que permita la justificación de la selección de un fármaco en base a los perfiles de resistencia, la invención proporciona una amplia y eficaz cobertura viral incluso en ausencia de estos datos. En realizaciones específicas, el virus de la gripe resistente a fármacos es resistente a uno de los fármacos de la combinación usada. Sorprendentemente, el tratamiento con la combinación triple proporciona un mayor efecto anti-gripe contra el virus resistente a fármaco que el tratamiento que es el mismo, excepto por la exclusión del fármaco al que el virus es resistente como monoterapia. Se usan procedimientos médicos estándar para evaluar la probabilidad de que un paciente esté infectado con el virus resistente a un fármaco o en riesgo de exposición al mismo (p. ej., mediante las guías de las Alertas Sanitarias de los CDC etc.).

Cada fármaco en la combinación es activa en una fase diferente en el ciclo de vida del virus de la gripe. Por ejemplo, los inhibidores de la adsorción del virus de la gripe y los inhibidores de M2 son activos al principio del ciclo de vida; los inhibidores de la IMP deshidrogenasa y los inhibidores de la ARN polimerasa son activos en el medio del ciclo de la vida y los oligonucleótidos de interferencia y los inhibidores de la neuraminidasa son activos al final del ciclo de vida.

Ejemplos de inhibidores de la adsorción del virus de la gripe incluyen anticuerpos monoclonales específicos de la hemaglutinina (véase, por ejemplo, Palladino y col., *J Virol.* (1995) 69:2075 - 81), polioxometalatos (véase, por ejemplo, Shigeta y col., *Antimicrob Agents Chemother.* (1997) 41:1423 - 7), polisacáridos sulfatados, proteínas de fusión de sialidasa (p. ej., Fludasa) y O - glicósidos de ácido siálico (véase, p. ej., Guo y col., *Glycobiology* (2002) 12:183 - 90). Estos y otros inhibidores de la adsorción del virus de la gripe se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, *Combating the Threat Of Pandemic Influenza: Drug Discovery Approaches*, Ed. Paul F. Torrence, John Wiley And Sons Ltd (2007), incorporado en el presente documento por referencia).

Ejemplos de inhibidores de M2 incluyen compuestos de aminoadamantano, tales como amantadina (1 - amino - adamantano, rimantadina (1 - (1 - aminoetil)adamantano), espiro[ciclopropano - 1,2' - adamantano] - 2 - amina, espiro[pirrolidina - 2,2' - adamantano], espiro[piperidina - 2,2' - adamantano], 2 - (2 - adamantil)piperidina, 3 - (2 - adamantil)pirrolidina, 2 - (1 - adamantil) piperidina, 2 - (1 - adamantil)pirrolidina y 2 - (1 - adamantil) - 2 - metil - pirrolidina; y anticuerpos monoclonales específicos de M2 (véase, por ejemplo, el documento US 20050170334; y Zebedee y Lamb, *J Virol.* (1988) 62:2762 - 72). Uno de los agentes antivirales en la combinación triple es amantadina.

Ejemplos de inhibidores de la IMP deshidrogenasa incluyen ribavirina, viramidina (un profármaco de ribavirina) y merimepodib (VX - 497; véase, por ejemplo, Markland y col., *Antimicrob Agents Chemother.* (2000) 44:859 - 66).

Como se usa en el presente documento, el término inhibidor de la ARN polimerasa se refiere a un agente antiviral que inhibe la actividad polimerasa, proteasa y/o endonucleasa del complejo de la ARN polimerasa viral o una de sus subunidades (es decir, PB1, PB2 y PA). Ejemplos de inhibidores de la ARN polimerasa incluyen análogos nucleosídicos antivirales tales como ribavirina, viramidina, 6-fluoro-3-hidroxi-2-piracinacarboxamida (T - 705), 2' - desoxi - 2' - fluoroguanosina, pirazofurina, 3 - deazaguanina, carbodina (véase, p. ej., Shannon y col., *Antimicrob Agents Chemother* (1981) 20:769 - 76) y ciclopenilcitosina (véase, por ejemplo, Shigeta y col., *Antimicrob Agents Chemother.* (1988) 32:906 - 11) y el inhibidor de la endonucleasa flutimida (véase, por ejemplo, Tomassini y col., *Antimicrob Agents Chemother.* (1996) 40:1189 - 93). Uno de los agentes antivirales en la combinación triple es ribavirina.

Ejemplos de oligonucleótidos de interferencia específicos de la gripe incluyen ARNs (véase, por ejemplo, Zhou y col., *Antiviral Res.* (2007) 76:186 - 93), oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de fosforotioato, ribozimas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.258.585 de Draper), morfolino oligómeros y ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, Schubert y Kurreck, *Handb Exp Pharmacol.* (2006) 173:261 - 87).

Ejemplos de inhibidores de la neuraminidasa incluyen oseltamivir, carboxilato de oseltamivir (GS4071; véase, por ejemplo, Eisenberg y col., *Antimicrob Agents Chemother.* (1997) 41:1949 - 52), zanamivir, peramivir (RWJ - 27021; BXC - 1812, BioCryst), ácido 2,3-didehidro - 2 - desoxi - N - acetilneuramínico (DANA), ácido 2 - desoxi - 2,3 - dehidro - N - trifluoroacetilneuramínico (FANA), A-322278, y A - 315675 (véase la patente de EE.UU. nº 6.455.571 de Maring y col. y Kati y col., *Antimicrob Agents Chemother.* (2002) 46:1014 - 21). Uno de los agentes antivirales en la combinación triple es oseltamivir.

En una realización, el primer agente antiviral es amantadina; el segundo agente antiviral es ribavirina y el tercer agente antiviral es oseltamivir.

Cada agente antiviral de la combinación se administra usando una o más vías de administración adecuadas para el agente concreto (p. ej., administración oral, parenteral, por inhalación, transdérmica, intranasal, gástrica (p. ej., mediante sondas de alimentación G, NG, J etc.). En varias realizaciones, los agentes antivirales se preparan para administración oral y/o gástrica (p. ej., mediante sondas de alimentación) como líquidos, jarabes, suspensiones, comprimidos, cápsulas, perlas en cápsulas o perlas en sobres. En algunas realizaciones, al menos uno de los agentes antivirales se administra por una vía de administración (p. ej., parenteral) y al menos uno de los agentes antivirales se administra por una vía de administración alternativa (p. ej., por vía oral o mediante inhalación).

En realizaciones de dosificación oral, uno o más de los agentes antivirales se puede proporcionar en una forma de liberación inmediata (IR) o de liberación extendida (ER). La preparación de las formas de dosificación ER (también denominadas en la técnica formas de dosificación "liberación controlada", "liberación sostenida" y "liberación modificada") es bien conocida. Formas de dosificación ER del inhibidor de M2 adecuadas se describen en los documentos USSN 11/285,905 y USSN 11/399,879, ambos concedidos a Went y col, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia. Los agentes antivirales se pueden administrar como formulaciones separadas, simultánea o secuencialmente. Como alternativa, se pueden proporcionar dos o más de los agentes antivirales como composiciones de combinación en formas de dosificación sencillas.

Al tratar una infección establecida por el virus de la gripe en un paciente que presenta síntomas de vómitos y/o diarrea, la administración parenteral es particularmente preferida, dado que la administración oral puede no ser eficaz para conseguir rápidamente las concentraciones plasmáticas deseadas de los agentes antivirales. Preferentemente, la administración parenteral se selecciona de infusión intravenosa, inyección intravenosa o inyección intramuscular. La más preferida es la infusión intravenosa. Un kit preferido para administración parenteral comprende un inhibidor de M2 (amantadina), un análogo nucleosídico antiviral (ribavirina) y un inhibidor de la neuraminidasa (oseltamivir), que se administran por vía parenteral junto con un vehículo farmacéuticamente activo en una única composición farmacéutica. En otras realizaciones, el inhibidor de M2, el análogo nucleosídico antiviral y el inhibidor de la neuraminidasa se administran por vía parenteral como formas de dosificación separadas. En algunas realizaciones, al menos uno del inhibidor de M2, el análogo nucleosídico antiviral y el inhibidor de la neuraminidasa se proporcionan inicialmente en forma de una composición liofilizada que se reconstituye con un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de la administración parenteral. En algunas realizaciones, el inhibidor de M2, el análogo nucleosídico antiviral y el inhibidor de la neuraminidasa se proporcionan inicialmente cada uno en un envase separado y después se combinan con un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de la administración parenteral. En algunas realizaciones, uno de los agentes antivirales se puede proporcionar en forma liofilizada que se reconstituye mediante una formulación líquida de uno de los otros agentes antivirales.

La concentración plasmática de cada fármaco de la combinación triple se mantiene, preferentemente, entre una $C_{mín}$ y una $C_{máx}$ deseadas durante al menos 24, 48, 72, 96, 120, 144 o 168 horas seguidas. Se usan ensayos clínicos rutinarios para determinar la $C_{mín}$ y una $C_{máx}$ promedio, y las concentraciones plasmáticas medias de una población de pacientes mediante varios regímenes de dosificación- La duración de la terapia normalmente es de 5-10 días por tratamiento o hasta que el virus ha desaparecido del paciente. Para profilaxis, la dosis diaria de los agentes antivirales administrados normalmente es del 50 % que la usada para tratamiento y se administra durante el curso de dos o más semanas, normalmente durante hasta aproximadamente 6 semanas o más hasta que desaparece el riesgo de infección.

La invención se ejemplifica adicionalmente más adelante con respecto a los usos de agentes antivirales específicos y combinaciones de agentes antivirales y las dosis y concentraciones a las que se usan. Dosis y concentraciones adecuadas de otros agentes antivirales que no se ejemplifican adicionalmente más adelante se pueden determinar usando información disponible en la literatura y mediante experimentación de rutina, tal como se describe en los ejemplos siguientes y se conoce generalmente en la técnica.

En una realización específica de la invención, el primer agente antiviral de la combinación triple es amantadina, que se administra al paciente en una cantidad que mantiene una concentración plasmática de la amantadina entre 0.05 $\mu\text{g/ml}$ ($C_{mín}$) a 5,0 $\mu\text{g/ml}$ ($C_{máx}$), preferentemente de 0,1 a 3,0 $\mu\text{g/ml}$, más preferentemente de 0,1 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$, y lo más preferentemente de 0,3 a 1,5 $\mu\text{g/ml}$ durante al menos 48 horas seguidas. La concentración plasmática deseada se puede conseguir administrando la amantadina por vía parenteral u oral en una cantidad de 5 a 500 mg/día, de 20 a 250 mg/día, de 100 a 800 mg/día, de 100 a 600 mg/día, de 200 a 700 mg/día o de 200 a 500 mg/día.

En algunas realizaciones, ejemplos de formas de dosificación oral de amantadina contienen al menos aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg por forma de dosificación y hasta aproximadamente 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350, o 400 mg por forma de dosificación. Una, dos, tres o cuatro de dichas formas de dosificación se pueden administrar una o dos veces al día para profilaxis o tratamiento. Las dosis diarias resultantes pueden ser al menos 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg al día y hasta aproximadamente 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750 u 800 mg/día. En un tratamiento de ejemplo, el paciente se autoadministra dos formas de dosificación unitaria ER de 125 mg de amantadina (p. ej., cápsulas o comprimidos) cada doce horas (es decir, BID) para un total de aproximadamente 500

mg/día de amantadina, tomados normalmente en combinación con ribavirina como se describe más adelante. Asimismo, en este ejemplo, la dosis profiláctica es una de 125 mg de forma de dosificación ER BID.

5 Para administración oral de 200 mg/día o más de amantadina se prefieren formulaciones ER, ya que permiten proporciones de C/C_{mín} mejores, de modo que se optimiza el tiempo en el que las concentraciones del inhibidor de M2 permanecen por encima de la DE₅₀, al tiempo que minimizan la toxicidad. En una formulación ER preferida, la amantadina tiene un perfil de disolución *in vitro* inferior a aproximadamente 70 % en peso en una hora, inferior a aproximadamente 90 % en peso en dos horas, superior a aproximadamente 40 % en peso en seis horas y superior a aproximadamente 85 % en peso en 12 horas, medido usando un sistema de disolución de tipo 2 de la USP (paletas) a 50 rpm a una temperatura de 37 ± 0,5 °C con 500 ml de agua como medio de disolución. También se prefiere una formulación ER de amantadina con un perfil de disolución *in vitro* inferior a 20 % en peso en una hora, inferior a aproximadamente 50 % en dos horas, superior a aproximadamente 40 % en seis horas y superior a aproximadamente 90 % en doce horas, medido como anteriormente. Esta reducción de la disolución puede reducir de forma ventajosa la variabilidad entre dosis en la concentración plasmática para el agente activo o mejorar la tolerabilidad del agente activo, especialmente cuando la administración es BID o QD. En ciertas realizaciones, la amantadina está en una forma de dosificación oral y tiene una T_{máx} de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 horas.

En una realización específica, se administra al paciente amantadina mediante infusión intravenosa a una velocidad de 1 a 50 mg/h, de 3 a 40 mg/h o de 5 a 30 mg/h durante al menos 48, 72 o 96 horas seguidas.

20 En una realización de la invención, el segundo agente antiviral de la combinación triple es ribavirina. En una realización preferida, la ribavirina se administra junto con amantadina en las cantidades mencionadas anteriormente. La ribavirina se administra al paciente en una cantidad para alcanzar una concentración plasmática de 0,1 µg/ml (C_{mín}) a 10,0 µg/ml (C_{máx}), de 0,5 a 8 µg/ml, de 0,5 a 5 µg/ml, de 1 a 6 µg/ml, de 1 a 4 µg/ml, de 2 a 6 µg/ml, de 2 a 4 µg/ml, de 0,01 a 2 µg/ml, o de 0,2 a 2 µg/ml durante al menos 48, 72 o 96 horas seguidas. La concentración plasmática deseada se puede conseguir administrando la ribavirina por vía parenteral u oral en una cantidad de 50 a 2400 mg/día, de 50 a 2.000 mg/día, de 50 a 1600 mg/día, de 100 a 1200 mg/día, de 400 a 800 mg/día, de 50 a 600 mg/día, de 75 a 500 mg/día o de 75 a 200 mg/día. En una realización preferida, la ribavirina se administra a dosis diarias bajas que tienen un efecto aditivo o sinérgico cuando se administra en combinación con amantadina o rimantadina y un inhibidor de la neuraminidasa, tal como oseltamivir. Las dosis bajas normalmente son de aproximadamente 10 - 800 mg/día, 25 - 600 mg/día, 50 - 600 mg/día y preferentemente de aproximadamente 75 - 500 mg/día. En un tratamiento de ejemplo, el paciente se autoadministra una forma de dosificación unitaria de 160 mg de ribavirina BID para un total de 320 mg/día de ribavirina.

35 En una realización específica, la ribavirina se administra por vía oral en cantidades de al menos aproximadamente 10, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg por forma de dosificación y hasta aproximadamente 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mg por forma de dosificación. Una, dos, tres o cuatro de dichas formas de dosificación se pueden administrar una o dos veces al día para profilaxis o tratamiento. Las dosis diarias resultantes pueden ser al menos 10, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg al día y hasta aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 1200, 1600 o 2000 mg/día. En un tratamiento de ejemplo, el paciente se autoadministra 2 formas de dosificación x 200 mg BID para un total de 800 mg/día. Asimismo, en este ejemplo, la dosis profiláctica es 1X 200 mg de forma de dosificación BID.

40 La ribavirina (y opcionalmente uno o todos los demás agentes antivirales) se puede administrar inicialmente en una cantidad de dosis de carga y, después, administrar en una cantidad de dosis de mantenimiento diaria, en la que la cantidad de dosis de carga es de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 veces la cantidad de la dosis de mantenimiento diaria. La dosis de carga se puede administrar por una vía que es la misma o diferente de la de la posterior dosis de mantenimiento. La dosis de carga se administra, preferentemente, por vía parenteral u oral, y, más preferentemente, por vía parenteral. Preferentemente, la dosis de carga se administra como infusión intravenosa, inyección intravenosa o inyección intramuscular. Con la infusión intravenosa, la dosis de carga se puede conseguir usando una concentración más alta del agente antiviral en la primera bolsa i.v. infundida al paciente. Como alternativa, la bolsa i.v. de infusión inicial puede tener la misma concentración de agentes activos que las posteriores bolsas i.v., pero se administra con una velocidad de infusión mayor (p. ej., 3-6 horas en comparación con 8 horas).

En una realización específica, se administra al paciente ribavirina mediante infusión intravenosa a una velocidad de 5 a 200 mg/h, de 10 a 150 mg/h, de 15 a 100 mg/h o de 20 a 80 mg/h durante al menos 48, 72 o 96 horas seguidas.

En una realización concreta de la invención, la ribavirina se administra junto con amantadina y oseltamivir en el tratamiento de un virus de la gripe que es resistente a amantadina u oseltamivir en monoterapia.

55 En una realización de la invención, el tercer agente antiviral de la combinación triple es un inhibidor de la neuraminidasa seleccionado del grupo que consiste en oseltamivir. El inhibidor de la neuraminidasa, oseltamivir, se administra al paciente en una cantidad para alcanzar una concentración plasmática de 0,001 a 5 µg/ml, de 0,02 µg/ml a 5 µg/ml, de 0,1 a 3 µg/ml, de 0,1 a 1 µg/ml, de 0,3 a 3 µg/ml, de 0,3 a 1 µg/ml, de 0,001 a 0,1 µg/ml o de 0,0001 a 0,01 µg/ml durante al menos 48, 72 o 96 horas seguidas. La concentración plasmática deseada se puede

conseguir administrando oseltamivir por vía parenteral u oral en una cantidad de 10 a 150 mg/día, de 10 a 50 mg/día, de 50 a 100 mg/día, de 75 a 150 mg/día, de 150 a 300 mg/día o de 100 a 500 mg/día.

En una realización preferida, el inhibidor de la neuraminidasa se administra a dosis diarias bajas que tienen un efecto aditivo o sinérgico cuando se administra en combinación con amantadina y ribavirina. En realizaciones específicas, el efecto sinérgico se consigue cuando las concentraciones plasmáticas de 0,15 - 1,5 µg/ml de amantadina, 0,0001 - 0,01 µg/ml de oseltamivir y 0,6 - 6 µg/ml de ribavirina se mantienen en el paciente durante al menos 48, 72 o 96 horas seguidas. Las dosificaciones específicas que consiguen estas concentraciones plasmáticas se determinan usando cálculos rutinarios y se confirman mediante ensayos clínicos. Las dosis bajas de oseltamivir son normalmente de aproximadamente 1 - 50 mg/día, preferentemente de aproximadamente 1 - 25 mg/día y más preferentemente de aproximadamente 2,5 -10 mg/día. En un tratamiento de ejemplo, el paciente se autoadministra una forma de dosificación unitaria de 25 mg de oseltamivir tomados QD o BID. En realizaciones preferidas, oseltamivir en cualquiera de las dosificaciones anteriores se toma en combinación con cualquiera de las cantidades descritas anteriormente de amantadina y ribavirina. En una realización específica, 25 mg de oseltamivir se toman QD o BID junto con 160 mg de amantadina y 160 mg de ribavirina (bien en formas de dosificación unitaria por separado o en una forma de dosificación unitaria de combinación) que también se toman QD o BID. En otra realización específica, 75 mg de oseltamivir se toman QD o BID junto con 100 mg de amantadina QD o BID y 600 mg de ribavirina QD o BID.

En una realización específica, se administra al paciente oseltamivir mediante infusión intravenosa a una velocidad de 0,1 a 20 mg/h, de 0,4 a 7 mg/h, de 1 a 7 mg/h, de 1 a 5 mg/h o de 2 a 7 mg/h durante al menos 48, 72 o 96 horas seguidas. La concentración plasmática deseada de zanamivir se puede conseguir mediante administración parenteral en una cantidad de 5 a 250 mg/día, de 10 a 200 mg/día o de 25 a 150 mg/día. En un ejemplo comparativo, se administra al paciente zanamivir mediante infusión intravenosa a una velocidad de 0,1 a 10 mg/h, de 0,4 a 7 mg/h o de 1 a 5 mg/h durante al menos 48, 72, o 96 horas seguidas.

En una realización, se administra al paciente oseltamivir por vía oral en una cantidad de 1 a 75 mg/día, de 1 a 50 mg/día, de 1 a 25 mg/día, de 10 a 150 mg/día, de 50 a 100 mg/día, de 75 a 150 mg/día o de 150 a 300 mg/día. En varias realizaciones, la cantidad de oseltamivir administrada de acuerdo con la presente invención, si está presente, puede ser de al menos aproximadamente 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 mg por forma de dosificación y hasta aproximadamente 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mg por forma de dosificación. Una, dos, tres o cuatro de dichas formas de dosificación se pueden administrar una o dos veces al día para profilaxis o tratamiento. Las dosis diarias resultantes pueden ser al menos , 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120,130,140 o 150 mg al día y hasta aproximadamente 75, 100, 120, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280 o 300 mg por día. En un tratamiento de ejemplo, el paciente se autoadministra una forma de dosificación de 75 mg BID para un total de aproximadamente 150 mg por día; para profilaxis, la dosis es de 75 mg tomados una vez cada 24 horas (QD).

Además de la triple terapia antiviral, el paciente puede recibir una terapia auxiliar para reforzar las respuestas antivirales naturales. Ejemplos de terapias auxiliares incluyen tratamiento con interferón, interferón pegilado, vitamina D (véase, por ejemplo, Cannell y col., *Epidemiol Infect.* (2006) 134:1129 - 40), geranilgeranilacetona (véase, por ejemplo, Unoshima y col., *Antimicrob Agents Chemother* (2003) 47:2914 - 21), poli ICLC (véase, por ejemplo, Wong y col., *Antimicrob Agents Chemother.* (1995) 39: 2574 - 6), Ampligen®, y oligodesoxinucleótidos-CpG (véase, por ejemplo, Lopez y col., *Vet Immunol Immunopathol.* 2006 Nov 15; 114(1 - 2):103 - 10). Dichas terapias auxiliares pueden ser particularmente beneficiosas para la profilaxis de la gripe. No obstante, para el tratamiento de las infecciones activas de la gripe puede ser deseable evitar ciertas terapias auxiliares (p. ej., tratamiento con interferón). En su lugar, los agentes antivirales se pueden administrar junto con tratamientos antiinmunitarios/antiinflamatorios, tales como corticosteroides (p. ej., metilprednisolona, hidrocortisona etc.) o estatinas (p. ej., atorvastatina, simvastatina etc.) para reducir la probabilidad de una "tormenta de citocinas".

Otro aspecto de la invención es una composición y uso de la misma para el tratamiento o profilaxis de la gripe en un paciente humano. En varias realizaciones, las composiciones se preparan para administración oral, parenteral o gástrica (p. ej., mediante sondas de alimentación) como líquidos, jarabes, suspensiones, comprimidos, cápsulas, perlas en cápsulas o perlas en sobres.

En una realización específica, la composición comprende amantadina y ribavirina y oseltamivir en formas de dosificación unitarias para administración oral, gástrica o parenteral. En una realización específica, una forma de dosificación única contiene amantadina en una cualquiera de las cantidades especificadas anteriormente (es decir, 25, 50, 75... 300 mg) en combinación con ribavirina en una cualquiera de las cantidades especificadas anteriormente (es decir, 25, 50, 75... 500 mg) y oseltamivir en una cualquiera de las cantidades especificadas anteriormente (es decir, 25, 30, 40... 200 mg). En una realización, la composición comprende una combinación de ribavirina y amantadina ER que tiene, preferentemente, un perfil de disolución in vitro y/o T_{máx} como se ha descrito previamente en lo que antecede,

En una realización, la composición comprende de 10 a 60 por ciento en peso (% p), de 25 a 50 % en peso o de 50 a 75 % en peso de amantadina; y de 30 a 80 % en peso, de 50 a 75 % en peso o de 25 a 50 % en peso de ribavirina, en la que los porcentajes en peso se basan en el peso total de los agentes activos en la composición. La

composición además comprende 0,5-30 % en peso de oseltamivir. En realizaciones preferidas, la composición contiene cantidades de amantadina y ribavirina que exhiben un efecto aditivo o sinérgico, como se ha descrito anteriormente, cuando se usa en combinación triple con un inhibidor de neuraminidasa tal como oseltamivir para el tratamiento o profilaxis de la gripe.

- 5 Para administración parenteral, la composición puede estar en forma de polvo liofilizado o líquido estéril contenido en un vial. El vial puede estar provisto de un tabique de caucho para permitir la entrada de la jeringuilla para reconstitución o extracción del contenido del vial.

Para administración oral, la composición puede estar en una forma de dosificación unitaria tal como una cápsula o comprimido. Una forma de dosificación unitaria de ejemplo para administración oral comprende 25 - 125 mg o 150 - 300 mg de amantadina, opcionalmente e forma de ER y 50 - 200 mg de ribavirina en comprimidos o cápsulas. Una forma de dosificación de la invención comprende 160 mg de amantadina HCL ER y 120 mg de ribavirina IR Otra forma de dosificación de ejemplo es una cápsula que comprende 160 mg de amantadina y 160 mg de ribavirina y 75 mg de oseltamivir.

15 Otro aspecto de la invención es un kit que comprende un inhibidor de M2 (amantadina), un análogo nucleosídico antiviral (ribavirina) y un inhibidor de la neuraminidasa (oseltamivir). Los agentes antivirales en el kit se pueden proporcionar en formas de dosificación separadas envasadas juntas, ya que ello puede maximizar la facilidad con la que la cantidad terapéutica adecuada se puede administrar a un sujeto que lo necesite.

En una realización específica, los kits comprenden sobres que contienen uno o más de los agentes activos. Los sobres pueden contener perlas de los agentes activos en una cantidad de dosis unitaria adecuada para administración oral, enteral o gástrica (p. ej., mediante sonda G, NG o J).

20 Cuando se proporcionan como un kit para administración oral, los agentes antivirales se pueden proporcionar en un paquete de tipo blíster. Los blíster individuales pueden contener un agente antiviral, o dos o los tres. Cuando se proporcionan como un paquete de tipo blíster, se prefiere que los agentes antivirales que se van a proporcionar a cada intervalo de dosis se identifiquen por separado, esto se puede conseguir proporcionando todas las formas de dosificación para cada dosis dentro de un solo blíster o, si se envasan en blíster distintos, los blíster que contienen las formas de dosificación para cada dosis se pueden agrupar o identificar como un grupo, por ejemplo mediante la impresión de las zonas que rodean los blíster. Normalmente, el kit incluye instrucciones de uso. En algunas realizaciones, el kit puede incluir uno o más contenedores de un inhibidor de M2 (amantadina) y un análogo nucleosídico antiviral (ribavirina) en un primer paquete, y el inhibidor de la neuraminidasa en un segundo paquete aparte. Por ejemplo, el kit puede comprender amantadina y ribavirina empaquetados juntos en un primer paquete de tipo blíster y cápsulas de 75 mg de oseltamivir en un segundo paquete de tipo blíster. Dichos kits se pueden preparar envasando de forma conjunta paquetes de tipo blíster de TAMIFLU® con paquetes de tipo blíster que comprenden ribavirina y amantadina. En otro kit de la invención, se usa un suministro a granel de TAMIFLU® (p. ej., una reserva del gobierno) como fuente de oseltamivir. El contenido de las cápsulas de TAMIFLU® se vacía, opcionalmente se vuelve a analizar para determinar la estabilidad durante la conservación, después se vuelve a encapsular en cantidades inferiores a 75 mg/cápsula (p. ej., 10, 25, 35, 50 mg), y se envasa conjuntamente con cantidades aditivas o sinérgicas de ribavirina y amantadina. La extensión de la vida de conservación de oseltamivir y la reducción de la dosis diaria necesaria para tratamiento o profilaxis de la gripe tiene el beneficio de extender considerablemente las reservas del gobierno de tratamiento antiviral para una pandemia de gripe.

40 En una realización, un kit comprende amantadina y ribavirina proporcionados como una pluralidad de formas de dosificación separadas, comprendiendo cada forma de dosificación de amantadina 75-250 mg de amantadina y comprendiendo cada dosis de ribavirina 50-400 mg de ribavirina. En una realización específica, un kit puede comprender uno o más paquetes de tipo blíster que comprenden una o más formas de dosificación que comprenden 125 mg de amantadina clorhidrato en una forma de dosificación de liberación extendida y una o más formas de dosificación que comprenden 200 mg de ribavirina. Los blíster en el paquete pueden estar dispuestos o marcados de modo que uno de cada tipo de forma de dosificación se administrará una o dos veces al día. Como alternativa, las formas de dosificación en los blíster pueden estar dispuestas de modo que indiquen que una de las formas de dosificación de amantadina se deberán administrar dos veces al día y una de las formas de dosificación de ribavirina se deberán administrar una vez al día, o las formas de dosificación en los blíster pueden estar dispuestas de modo que indiquen que dos de las formas de dosificación de amantadina y una de las formas de dosificación de ribavirina se deberán administrar una vez al día. Opcionalmente, el paquete de tipo blíster se puede configurar para inducir una o más formas de dosificación que comprenden 75 mg de oseltamivir configurados o marcados de forma similar para administrarse una o dos veces al día. Las figuras 1 y 2 de los dibujos adjuntos ilustran configuraciones representativas. Como alternativa, el kit se puede formatear para optimizar su uso conveniente junto con un inhibidor comercialmente disponible de la neuraminidasa (p. ej., TAMIFLU®).

En otra realización, se puede proporcionar un kit que comprenda uno o más paquetes de tipo blíster, en el que cada paquete de tipo blíster comprende uno o más grupos de blíster y dentro de cada grupo de blíster uno de los blíster contiene uno o dos formas de dosificación en comprimido o cápsula que comprenden de 60 a 300 mg de amantadina en una formulación de liberación extendida y uno de los blíster contiene uno o dos formas de dosificación en comprimido o cápsula que comprenden de 25 a 200 mg de ribavirina. El número de grupos con un

paquete de tipo blíster o el número de grupos proporcionados en el kit puede variar de uno a aproximadamente 5, 7, 10, 14, 15, 20, 21, 28, 30, 40, 42 o 60. Opcionalmente, dicho kit incluye instrucciones para administración una vez o dos veces al día.

5 Otro kit de ejemplo para administración oral de amantadina junto con ribavirina comprende formas de dosificación unitaria de 80 mg, 180 mg, o 330 mg de amantadina en forma de liberación inmediata o de liberación extendida; y formas de dosificación unitaria de 330 mg o 660 mg de ribavirina. En un tratamiento de ejemplo, se administra a un paciente de 660 a 25400 mg de RBV t de 360 a 660 mg de amantadina como primera dosis (p. ej., día 1 AM), después (p. ej., Día 2 AM a Día 10), se administra al paciente de 660 a 1320 mg de RBV t de 180 a 660 mg de amantadina una vez al día (QD).

10 Cuando se proporciona como un kit para tratamiento parenteral se proporcionan dos o más de los agentes antivirales de la combinación en forma adecuada para administración parenteral. Por ejemplo, los agentes antivirales se pueden formular individualmente o coformular y cargar en contenedores adecuados, tales como jeringuillas, ampollas o viales. Los agentes activos se pueden proporcionar en forma de una composición liofilizada en un contenedor y reconstituir con un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de la administración parenteral. En otras realizaciones, los agentes activos se pueden proporcionar en una forma líquida en un contenedor que se puede administrar sin dilución (p. ej., para administración en bolo i.v. o i.m.) o, como alternativa, añadidos a una bolsa de infusión i.v. En algunas realizaciones, uno de los agentes antivirales se puede proporcionar en forma liofilizada, que, antes de la administración a un paciente, se reconstituye con una forma líquida de otro agente antiviral proporcionado en el kit. En algunas realizaciones, un inhibidor de M2 (amantadina), un análogo nucleosídico antiviral (ribavirina) y un inhibidor de la neuraminidasa (oseltamivir) están, cada uno, en un envase separado y después se combinan los agentes activos con un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de la administración parenteral. Cada contenedor puede contener una dosis unitaria del(los) agente(s) activo(s) y cada kit puede tener un número suficiente de los contenedores para tratar a un paciente individual durante al menos 12, 24, 48 o 72 horas. El kit puede tener un contenedor marcado claramente para una dosis de carga de uno o más de los agentes activos con instrucciones que indiquen que el contenedor marcado claramente es el primero usado al iniciar el tratamiento de un paciente. Como alternativa, las dosis de carga se pueden envasar por separado y pueden tener instrucciones de uso aparte. Ejemplos de kit para tratamiento oral se detallan adicionalmente en los Ejemplos 5-9 a continuación. Ejemplos de kit para administración parenteral se describen en el Ejemplo 11 a continuación.

30 **Ejemplo 1A: Estudio de respuesta a la dosis de la actividad antiviral de amantadina, oseltamivir y ribavirina, por separado y en combinaciones de dos y de tres, en células MDCK infectadas con A/Albaoy/1/98 (H31Y2) cultivadas en matraces.**

Los inventores realizaron experimentos diseñados para evaluar la actividad antiviral de respuesta a la dosis de una combinación de amantadina, oseltamivir y ribavirina en la inhibición de la replicación viral de A/Albany/1/98(H3N2). Los objetivos del experimento eran demostrar una reducción de la carga viral en comparación con ningún fármaco y los efectos sinérgicos de combinaciones dobles y triples en comparación con monoterapia.

40 La CE₂₅, CD₅₀ y CE₇₅ (en las que, por ejemplo, la CE₅₀, es la concentración de fármaco que reduce el 50 % del virus a las 72 horas) para cada fármaco se demostraron en estudios de intervalos de dosis usando cada fármaco como monoterapia. Brevemente, a las células MDKC cultivadas en matraces usando los procedimientos descritos anteriormente se añadieron compuestos a dosis variables (Smee y col., Chemotherapy (2002) 48:88 - 93). Treinta minutos después de la adición del fármaco se añadieron virus a una multiplicidad de infección de 0,001 UFP por célula a cada pocillo. Tras ~24 - 78 horas, se extrajo el medio de virus extracelular de cada pocillo, se centrifugó a 3.200 g durante 5 minutos y se tituló para buscar virus. Los resultados se proporcionan en la Tabla 1A.

Tabla 1A

Fármaco	Nivel de inhibición	C <i>In vitro</i>	C diana en suero
Amantadina	CE25	0,054 µg/ml	0,288 µm
Amantadina	CE50	0,091 µg/ml	0,480 µm
Amantadina	CE75	0,153 µg/ml	0,815 µm
Oseltamivir	CE25	0,025 ng/ml	0,080 µm
Oseltamivir	CE50	0,050 ng/ml	0,160 nM
Oseltamivir	CE75	0,075 ng/ml	0,240 nM
Ribavirina	CE25	0,310 µg/ml	0,760 µm

(continuación)

Fármaco	Nivel de inhibición	C In vitro	C diana en suero
Ribavirina	CE50	0,420 µg/ml	1,030 µm
Ribavirina	CE75	0,615 µg/ml	1,500 µm

5 Las concentraciones CE₂₅, CE₅₀, y CE₇₅ para cada fármaco se analizaron por separado y en todas las posibles combinaciones dobles y triples para los efectos aditivos y/o sinérgicos sobre la replicación viral en cultivo tisular, para un total de 64 condiciones analizadas (es decir, sin fármaco, 9 tratamientos sencillos, 27 tratamientos de combinación doble y 27 tratamientos de combinación triple). Brevemente, las células MDCK se cultivaron como monocapas en matraces, se añadieron los fármacos al cultivo y las células se infectaron mediante la introducción del virus A/Albany a una multiplicidad de infección (MOI), es decir la proporción de partículas infecciosas del virus y el número de células infectadas, de 0,001 UFP por célula. El cultivo se mantuvo durante ~48 horas o hasta que el efecto citopático fue evidente en la monocapa. Tras la centrifugación, los sobrenadantes se almacenaron a -70 °C como 3 alícuotas de 500 µl para DICT₅₀, UFP y análisis NA y 1 z 200 µl para QPCR.

15 Las combinaciones de fármacos se determinaron sinérgicas si la inhibición real de la replicación viral era mayor que la inhibición calculada usando el software MacSynergy II como han descrito Prichard y col. (Antimicrob Agents Chemother (1993) 37:540 - 545). Se observó una fuerte sinergia con las combinaciones dobles de amantadina con ribavirina y amantadina con oseltamivir, a concentraciones suficientemente bajas que tendrán como resultado menos efectos secundarios adversos en seres humanos. Además, las combinaciones triples con amantadina a CE₂₅ y CE₅₀ demostraron un fuerte efecto sinérgico a concentraciones que minimizarían o evitarían los efectos secundarios.

Ejemplo 1B: Estudio de respuesta a la dosis de la actividad antiviral de amantadina, oseltamivir y ribavirina en combinación en células MDCK infectadas con A/Sydney/05/97 H3N2.

20 El objetivo de este estudio era demostrar que la combinación triple de amantadina, oseltamivir y ribavirina reduce la carga viral en comparación con ningún fármaco y exhibe un efecto sinérgico en comparación con la monoterapia. Los procedimientos usados fueron los mismos que los usados en el ejemplo 1A, excepto por lo que se indica más adelante.

25 Las células MDCK se cultivaron como monocapas en placas de 96 pocillos y se infectaron mediante la introducción del virus A/Sydney/ 05/97 H3N2 a una MOI de 0,01 UFP por célula. Los fármacos se añadieron en cada una de las 216 posibles combinaciones a las concentraciones siguientes. amantadina a 0, 0,032, 0,1, 0,32, 1,0, y 3,2 µg/ml; oseltamivir a 0, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032, y 0,1 µg/ml; y ribavirina a 0, 0,032, 0,1, 0,32, 1,0, y 3,2 µg/ml.

30 El procedimiento analítico tridimensional descrito por Prichard y Shipman (1990), supra, y Prichard y col. (1993), se usó para visualizar los datos tal como se representan en la FIG. 5 anterior. La amantadina en combinación doble con ribavirina u oseltamivir demostró sinérgica, mientras que la combinación doble de oseltamivir con ribavirina no fue sinérgica. La sinergia se observó en los siguientes intervalos de concentración: amantadina a 0,1 - 1 µg/ml, ribavirina a 0,032 - 1,0 µg/ml, y oseltamivir a 0,001 - 0,032 µg/ml. Estas concentraciones corresponden a dosis diarias humanas de aproximadamente 50 - 200 mg de amantadina, 200 - 600 mg de ribavirina y 2,5 - 25 mg de oseltamivir. La sinergia no se demostró en las concentraciones de amantadina por encima de 1 µg/ml debido al límite del ensayo de detección (es decir, había una inhibición completa de la carga viral).

35 El experimento demostró además las interacciones sinérgicas de los tres fármacos cuando se usan en combinación. La sensibilidad del virus a cada fármaco cuando se usa en combinación triple mejoró de 10 a más de 100 veces en comparación con cada fármaco usado como monoterapia. Por ejemplo, la monoterapia con amantadina a una concentración de 1 µg/ml tuvo como resultado una reducción de aproximadamente el 60 % de la carga viral, mientras que se consiguió aproximadamente la misma reducción de la carga viral con amantadina a 0,1 µg/ml en combinación con ,01 µg/ml de oseltamivir y 0,32 µg/ml de ribavirina, que demuestra una multiplicación por 10 de la sensibilidad a la amantadina. La monoterapia con oseltamivir a una concentración de 0,1 µg/ml tuvo como resultado una reducción de aproximadamente el 50% de la carga viral, mientras que oseltamivir a 0,001 µg/ml en combinación con 0,32 µg/ml de amantadina y 0,23 µg/ml de ribavirina tuvo como resultado una reducción de aproximadamente el 65 % de la carga viral, que demuestra una multiplicación superior a 100 en la sensibilidad a oseltamivir. La monoterapia con ribavirina a concentraciones de 1 µg/ml and 3,2 µg/ml tuvo como resultado reducciones de aproximadamente 10 % y 95 % en la carga viral, respectivamente, mientras que la ribavirina a 0,032 µg/ml en combinación con 0,032 µg/ml de amantadina y 0,01 µg/ml de oseltamivir tuvo como resultado una reducción de aproximadamente el 95 % en la carga viral, que demuestra una multiplicación por 100 en la sensibilidad a la ribavirina.

Ejemplo 1C: Estudio para determinar la eficacia de la monoterapia y la terapia de combinación en un ensayo cinético *in vitro*

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia antiviral de la amantadina, oseltamivir y ribavirina como agentes únicos y en combinación en un modelo cinético *in vitro* de la infección por el virus de la gripe A/Victoria/3/75 (H3N2). La eficacia se evaluó mediante reducción de la carga viral, medida mediante CCID50 y PCRc e inhibición del efecto citopático viral (ECP) determinado mediante inspección visual. Un objetivo secundario era determinar la dosis infecciosa óptima y los intervalos de dosificación adecuados para cada fármaco como agentes únicos y como la combinación.

Los grupos de tratamiento se indican en la Tabla 1C. Cada grupo se analizó por separado y en las líneas celulares MDCK y SIAT.

Tabla 1C Diseño del estudio

Grupo ^a	Tratamiento	Amantadina (µg/ml)	Oseltamivir (µg/ml)	Ribavirina (µ/ml)
Grupos de tratamiento con un solo agente				
1	Placebo	-	-	-
2	Amantadina (0,15)	0,15		
3	Amantadina (0,5)	0,5		
4	Amantadina (1,5)	1,5		
5	Oseltamivir (0,0001)		0,0001	
6	Oseltamivir (0,001)		0,001	
7	Oseltamivir (0,01)		0,01	
8	Ribavirina (0,6)			0,6
9	Ribavirina (2,0)			2,0
10	Ribavirina (6,0)			6,0
Grupos de tratamiento de combinación				
11	Combo (0,15/0,0001/0,6)	0,15	0,0001	0,6
12	Combo (0,5/0,001 /2,0)	0,5	0,001	2,0
13	Combo (1,5/0,01/6,0)	1,5	0,01	6,0
^a Cada grupo se analizó por duplicado y en las líneas celulares MDCK y SIAT-1.				

Las células MDCK y SIAT - 1 se sembraron en matraces T25 a una densidad celular de 4×10^5 células/ml, en un total de 5 ml, en medio de crecimiento. Las células se dejaron adherir a los matraces durante la noche y al día siguiente se inspeccionó los matraces para verificar que las células tenían una confluencia ~70%. Las células se lavaron una vez con 5 ml de medio de infección con o sin fármacos.

A T= 0, los matraces se infectaron con A/Influenza/3/75 (H3N2), a una dosis infecciosa de $\sim 10^1$ CCID50/ml. Después de 2 horas se extrajo el medio y las células se lavaron una vez con 5 ml de medio de infección con fármaco. El medio de lavado se descartó y se añadieron 5 ml del medio de infección fresco con fármaco.

A las 24 horas, se sacaron los matraces del incubador y se inspeccionaron visualmente para determinar el ECP. El ECP, una indicación de la viabilidad celular, se evaluó cualitativamente puntuando los matraces en una escala de 0 a 4, siendo 4 e ECP máximo. La puntuación es una estimación del % de viabilidad. Un matraz con un 100 % de muertes recibe una puntuación de 4. Un matraz con un 75 % de muertes recibe una puntuación de 3, 50 % = 2, 25 % = 1 y 0 % = 0. Después se extrajo completamente el medio de los matraces y se extrajo un alícuota y se congeló para la posterior cuantificación de la carga viral mediante análisis de la DIC50. La monocapa celular se lavó dos veces con 5 ml de medio de infección con o sin fármacos y se añadieron 5 ml de medio de infección con o sin fármaco. Después, los matraces se devolvieron al incubador. A T = 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas, se repitió el procedimiento. Se realizó la evaluación del ECP y las muestras para la cuantificación de la carga viral se recogieron

para cada régimen en cada punto de tiempo.

Tras el último punto de tiempo, todas las muestras con carga viral se descongelaron y la carga viral para cada punto de tiempo se determinó mediante análisis CCID50. Las células MDCK se sembraron en placas de 384 pocillos a 4×10^5 células por ml con un volumen de 50 µl por pocillo. Las células se dejaron adherir durante la noche. Después, a la placa se añadieron 50 µl de virus diluido en serie y las placas se devolvieron al incubador. Las placas se sacaron del incubador los días 3 y 6 y se puntuaron visualmente para el ECP. Tras 6 días, las placas se congelaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en preparación para la secuenciación de Sanger.

DICC50, definida como la dosis a la que el 50 % de los pocillos están infectados, se calcula usando el cálculo de Karber (Karber, 1931), dado mediante la ecuación: $\log \text{DICC50} = L - d(S - 0,5)$, donde: L = log de la dilución menor usada en el ensayo; d = diferencia entre las etapas de dilución log; y S = suma de la proporción de "ensayos positivos" (es decir, cultivos que muestran ECP)

En ausencia de fármacos, las ramas de placebo produjeron un título viral máximo a las 48 horas de la infección en las líneas celulares SIAT-1 y MDCK. Los títulos virales máximos fueron similares para las líneas celulares SIAT - 1 y MDCK, produciendo las células SIAR-2 $6,75 \log_{10} \text{CCID50}/0,05 \text{ ml}$ en un periodo de 24 horas medido a las 48 horas de la infección, y las células MDCK produciendo $6,25 \log_{10} \text{CCID50}/0,05 \text{ ml}$. El virus pareció replicarse más rápido en las células SIAT y MDCK; a las 24 horas de la infección, el título viral fue $4 \log_{10} \text{CCID50}/0,05 \text{ ml}$ para SIAT y $2.25 \log_{10} \text{CCID50}/0,05 \text{ ml}$ para células MDCK. Después de alcanzar el máximo, la producción de virus descendió en ambas líneas celulares. Posiblemente, el descenso del título viral se debe a que todas las células se han infectado y han muerto por la infección.

Se produjo una buena correlación entre la carga viral y la viabilidad celular, muriendo las células concurrentes con el título viral máximo o poco después. Por ejemplo, para las células SIAT, la carga viral máxima para el grupo de placebo se produjo a las 48 horas y la muerte celular completa (0 % de viabilidad celular) se produjo a las 48 horas; para las células MDCK, la carga viral máxima se produjo a las 48 horas y la muerte celular completa se produjo a las 72 horas.

El tratamiento con los fármacos como agentes únicos dio una inhibición de la carga viral dependiente de la dosis a las 24 horas en las células SIAT y MDCK. En el punto de tiempo de 24 horas, cada fármaco como agente único a la dosis alta redujo la carga viral en 34 logs en comparación con el grupo placebo en células SIAT y en 2 los en células MDCK. Para los tres fármacos como agentes únicos, la inhibición observada en el punto de tiempo de 24 horas no se mantuvo y se puede detectar un título viral elevado en puntos de tiempo posteriores. Por tanto, ninguno de los regímenes de tratamiento con un solo agente tuvo éxito en la inhibición completa de la replicación del virus, aunque en todos los casos el tratamiento con un solo agente retrasó el máximo de la producción viral en 24 a 48 horas en comparación con el placebo.

Los datos de viabilidad celular para los regímenes de tratamiento con un solo agente fueron consistentes con los datos de carga viral. El tratamiento con un agente solo pudo retrasar, pero no inhibir, la mortalidad celular. En las células SIAT, todos los grupos de agente único tuvieron una mortalidad celular completa a las 72 horas, en las que la dosis alta de cada fármaco retrasa la muerte celular en 24 horas en comparación con el placebo. En células MDCK, el tratamiento con un solo agente retrasa muerte celular en un máximo de 48 a 72 horas en comparación con el placebo. En términos de viabilidad celular, el mejor régimen de agente único fue de $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ de la dosis de amantadina, mientras que no se observó una muerte celular sustancial hasta las 144 horas de la infección.

Los regímenes de combinación también mostraron una inhibición de la replicación del virus dependiente de la dosis. En las células SIAT, el grupo de combinación de dosis baja retrasó la producción máxima del virus en 24 horas en comparación con el placebo y el grupo de combinación de dosis media retrasó la producción máxima del virus en 48 horas. En ambos grupos, la producción de virus alcanzó títulos relativamente altos de $6,1$ y $4,9 \log_{10} \text{CCID50}/0,05 \text{ ml}$ para la dosis baja y media, respectivamente, aunque la carga viral como una función del tiempo se redujo sinérgicamente más de 2 veces a todos los tiempos medidos. No obstante, el grupo de combinación de dosis alta inhibió completamente la producción de virus a niveles indetectables hasta el último punto de tiempo tomado a las 168 horas de la infección. Consistente con la inhibición completa de la producción de virus, las células en el grupo de combinación de dosis alta también quedaron protegidas completamente de la muerte celular hasta el último punto de tiempo medido a las 168 horas de la infección. Dado el hecho de que las células SIAT y MDCK fueron un 100% viables en este régimen a lo largo de todo el curso del estudio, se puede concluir que la combinación de los tres fármacos a la dosis alta analizada no fue citotóxica y que la inhibición de la producción de virus se debía a los efectos antivirales sinérgicos de los fármacos en la combinación y no son una consecuencia artificial de la citotoxicidad. Las dosis de combinación baja y media retrasaron la muerte celular en 24 y 96 horas en células SIAT, respectivamente, y en 73 y 96 horas en las células MDCK, respectivamente. Además, a estos índices bajos de replicación viral, la combinación triple suprime completamente la formación de resistencia.

Por tanto, las combinaciones triples pueden conducir a una reducción sinérgica del índice de crecimiento del virus de la gripe y de la resistencia. Más específicamente, al usar un inhibidor de M2 (p. ej., amantadina), un inhibidor de la neuraminidasa (p. ej., oseltamivir, zanamivir) y un inhibidor de la replicación (p. ej., ribavirina), hay una reducción sinérgica superior a 2 veces de la tasa de crecimiento sobre los intervalos de concentración de amantadina a $0,15 -$

1,5 µg/ml, oseltamivir a 0,0001 - 0,01 µg/ml y ribavirina a 0,6 - 6 µg/ml.

Ejemplo 2: Efecto de las combinaciones triples de amantadina, oseltamivir y ribavirina sobre la gripe H3N2 silvestre en el sistema de fibras huecas

5 Los inventores han diseñado este experimento para analizar el efecto de la combinación triple de amantadina, oseltamivir y ribavirina sobre la replicación del virus en el modelo de fibras huecas usando los procedimientos descritos previamente (Drusano y col., Antimicrob Agents Chemother (2002) 46:464 - 470). Los fármacos, solos o en combinación, se liberaron a concentraciones constantes mediante infusión continua en el equilibrio durante 168 horas. Brevemente, 10⁸ células MDCK se cultivaron en fibras huecas y se infectaron mediante la introducción de 10² células infectadas por el virus de la gripe, se aplicaron en el medio de cultivo celular en un sistema de fibras huecas de reservorio dual. Se analizó una cepa silvestre A/Albany (H3N2). El cultivo se mantuvo durante 168 horas. A T = 10 24, 48, 72, 96, 120, 144, y 168 horas tras la infección, las muestras se extrajeron de la fibra hueca y se titularon para determinar el título viral. En el lado del fármaco de la fibra hueca, se realizaron doce experimentos independientes para analizar las combinaciones y concentraciones del fármaco mostradas en la Tabla 2:

Tabla 2

Rama	Fármaco		
	Amantadina (µg/ml)	Oseltamivir (ng/ml)	Ribavirina(µg/ml)
1	0	0	0
2	0,1		
3	1,0		
4		1	
5		10	
6			0,5
7			5
8	0,1	1	0,5
9	0,1	10	5
10	1	1	0,5
11	1	10	0,5
12	1	10	5

15 Las muestras se extrajeron de la fibra hueca a varios puntos de tiempo para determinar el número de virus infecciosos. Los virus de varios puntos de tiempo también se secuenciaron mediante el método de Sanger para determinar la secuencia de los genes NA, HA y M2. Una reducción en la variación de la secuencia con el tratamiento de combinación comparado con el tratamiento con fármacos solos demuestra que las combinaciones triples inhiben 20 la generación de mutantes resistentes a uno cualquiera de los fármacos.

La amantadina sola tuvo un efecto insignificante a dosis bajas y una reducción de 2-3 log en el título a 48 horas a dosis altas; oseltamivir solo produjo una reducción ~1 log a ambas dosis; y la ribavirina sola tuvo un efecto insignificante a dosis bajas y una reducción de ~3 log a 48 horas a la dosis alta. La combinación de los tres fármacos a dosis bajas tuvo como resultado una reducción de -8 log en el título a las 48 horas, una reducción sinérgica de 25 4log del crecimiento viral. La combinación de los tres fármacos a dosis altas tuvo como resultado una inhibición sinérgica y completa (es decir, > 8 log) en todos los puntos de tiempo. La combinación triple demostró de este modo sinergia a las concentraciones siguientes: amantadina a 0,1 - 1 µg/ml, oseltamivir a 0,01 - 1,0 µg/ml, y ribavirina a 0,5 - 5 µg/ml.

30 Estas concentraciones corresponden a dosis diarias humanas de aproximadamente 50 - 700 mg de amantadina, 200 - 2.500 mg de ribavirina y 2,5 - 10 mg de oseltamivir.

Además, las ramas de monoterapia para amantadina y oseltamivir tuvieron como resultado una formación apreciable de resistencia al fármaco M2 y NA, mientras que la rama de triple dosis alta no.

Ejemplo 3A: Efecto de las combinaciones triples de amantadina, oseltamivir y ribavirina sobre el tratamiento de la gripe en ratones

Los inventores diseñaron este experimento para determinar los efectos de la combinación triple de amantadina, oseltamivir y ribavirina en un modelo en ratones de infección de gripe.

5 Ratones hembra (17-18 g) fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal (i.p.). Aproximadamente 12 horas antes de la exposición al virus, en el lomo dorsal de los ratones se insertaron quirúrgicamente por vía subcutánea bombas osmóticas de Alzet que contenían amantadina. En el momento de la infección se anestesió de nuevo a los ratones con ketamina. Se les infectó por vía intranasal (i.n.) con aproximadamente 2×10^4 dosis infecciosas de cultivo celular (DICC50) del virus A/Victoria/3/75 (H3N2) por ratón con un volumen de inóculo de 90 μ l. Los primeros tratamientos orales (por sonda) con oseltamivir y ribavirina se

10 administraron poco antes de la infección y continuaron después una vez al día durante 7 días consecutivos (a intervalos de 12 horas). Había 20 animales tratados con placebo, que recibieron agua por sonda oral e, inicialmente, 12 ratones por grupo de tratamiento con fármaco. Los ratones se mantuvieron en observación 21 días para determinar la muerte y se pesaron como grupo en días alternos.

15 Mediante la bomba de Alzet se administró amantadina a 3 mg/ml o 10 mg/ml para liberar 4 mg/kg/día o 13 mg/kg/día, respectivamente; oseltamivir se administró a 30 mg/kg/día o 10 mg/kg/día mediante sonda oral; y la ribavirina se administró a 7 mg/kg/día o 21 mg/kg/día mediante sonda oral. Los fármacos se administraron como monoterapia y en las seis posibles combinaciones triples.

20 Todos los tratamientos de monoterapia fueron muy eficaces contra la infección en la prevención de la muerte, a excepción de amantadina a 3 mg/ml y ribavirina a 7 mg/kg/día. Los tiempos transcurridos hasta la muerte aumentaron significativamente a estas dosis y la tasa de supervivencia del 27 % (3 supervivientes de 11) con 3 mg/ml de amantadina fue significativamente diferente de la observada en el control con placebo.

25 Todas las terapias de combinación previnieron la mortalidad en un 90-100 %. Esto no era inesperado, debido al hecho de que la monoterapia con oseltamivir por sí misma proporcionó un beneficio sobre la supervivencia del 92-100 % a 10 y 30 mg/kg/día y oseltamivir a estas dosis eficaces era un componente de todas las combinaciones. La dosis de 10 mg/ml de amantadina fue asimismo protectora en un 92 %, por lo que las combinaciones con este agente también serían altamente protectoras.

30 El tiempo hasta la muerte de los ratones tratados con amantadina a 3 mg/ml y ribavirina a 7 mg/kg/día fue suficiente para mostrar retrasos en la muerte que diferían de lo observado en el control tratado con placebo. La(s) otra(s) dosis de cada compuesto fue altamente protectoras. Los compuestos usados en combinación mostraron patrones de muerte similares a los de las dos dosis de oseltamivir o la dosis de 10 mg/ml de amantadina.

35 El hecho de que todos los regímenes de combinación triple fueran iguales o mejores que los regímenes de monoterapia sugiere que los tres fármacos no eran antagonistas en la combinación a las dosis analizadas. Si se produjo un antagonismo significativo entre cualquiera de los tres fármacos, cabe esperar que la combinación triple proporcione menor eficacia que la monoterapia.

40 En general, los datos de supervivencia no eran útiles en la evaluación del beneficio alcanzado usando los fármacos en combinación. No obstante, se demostró que los datos de peso corporal eran útiles en la evaluación del beneficio de los compuestos en combinación. La infección produjo graves descensos del peso corporal en el grupo tratado con placebo. La pérdida de peso durante la infección fue mínima en el grupo tratado con 10 mg/ml de amantadina, pero la pérdida de peso fue más sustancial en los otros cinco grupos de monoterapia (es decir, amantadina a 3 mg/ml, oseltamivir a 10 o 30 mg/kg/día y ribavirina a 7 o 21 mg/kg/día). Usando los criterios de mortalidad del RU/UE para estudios con animales (muerte= 20 % de pérdida de peso), los inventores encontraron que 10 mg/kg/día de oseltamivir protegía al 40 % de los ratones, amantadina a 3 mg/ml protegía al 10 % y ribavirina a 7 mg/kg/día protegía al 0 %. Cuando se usó como combinación triple a las mismas concentraciones de fármaco, se protegió al

45 100 % de los ratones. Dado que amantadina a 10 mg/ml era altamente protectora como monoterapia, no se produjo una gran diferencia en el peso entre la monoterapia y las combinaciones, pero seguía habiendo una diferencia favorable a la combinación como tratamiento superior. La formación de resistencia en las ramas de administración triple fue mucho menor que la registrada en las ramas de monoterapia (0 frente a 2 %).

50 Estos resultados demostraron que la combinación triple que contenía amantadina, oseltamivir y ribavirina era eficaz a la hora de proporcionar beneficio de eficacia y resistencia a los ratones infectados con el virus de la gripe A (H3N2).

Ejemplo 3B: Efecto de las combinaciones triples de amantadina, oseltamivir y ribavirina sobre el tratamiento de la gripe en ratones

55 Se repitió el experimento anterior excepto porque el tratamiento no comenzó hasta 24 o 48 horas después de infectar a los ratones con el virus y se usaron las siguientes concentraciones de fármaco: amantadina a 28 mg/kg/día, oseltamivir a 10 mg/kg/día y ribavirina a 40 mg/kg/día.

En el estudio en el que el tratamiento se inició 24 horas después de la infección, el día 9 después de la infección tanto los grupos de monoterapia con amantadina como de monoterapia con oseltamivir presentaron un 100 % de mortalidad (usando los criterios de mortalidad del RU/UE); el grupo de monoterapia con ribavirina presentó una supervivencia del 20 % y el grupo de la terapia de combinación triple presentó una supervivencia del 90 %.

5 En el estudio en el que el tratamiento se inició 48 horas después de la infección, el día 9 todos los grupos presentaban una pérdida de peso superior al 20 %. No obstante, el grupo de terapia con combinación triple presentaba la menor cantidad de pérdida de peso a aproximadamente el 22 %; el grupo de monoterapia con ribavirina tenía una pérdida de peso de aproximadamente 26 % y los grupos de monoterapia con amantadina y de monoterapia con oseltamivir tenían una pérdida de peso cada uno de casi un 35 %. El día 13, todos los grupos de
10 tratamiento habían comenzado a ganar peso, pero la ganancia de peso en el grupo de terapia con combinación triple fue significativamente mayor, los animales de este grupo presentaban aproximadamente el 90 % de su peso original. En comparación, los animales en el grupo de monoterapia con ribavirina pesaban aproximadamente el 80 % de su peso original y a los animales en los grupos de monoterapia con oseltamivir y de monoterapia con amantadina no les fue mejor que a los controles sin tratar (aproximadamente el 65-70 % de su peso original).

15 **Ejemplo 4: Estudio de respuesta a la dosis de la actividad antiviral de amantadina, oseltamivir y ribavirina en combinación en células MDCK infectadas con H5N1 cultivadas en matraces**

Los inventores diseñaron este experimento para evaluar la actividad antiviral de respuesta a la dosis de una combinación de amantadina, oseltamivir y ribavirina en la inhibición de la replicación viral de A/Indonesia/05/2005 (H5N1) and A/Vietnam/1204/2004 (H5N1) y la generación de mutantes resistentes a los fármacos. Los objetivos del
20 experimento eran demostrar una reducción de la carga viral en comparación con ningún fármaco y el efecto sinérgico de la combinación en comparación con la monoterapia. Las células MDCK se cultivan en monocapas en placas de 96 pocillos. A T = 0, 150 µl de virus a 20 DICT50/ml at 20 TCID50/ml se añade a las células. Poco después, a los pocillos se añaden 50 µl del fármaco, solo o en combinación, para dar las concentraciones finales indicadas. Los fármacos se analizan a las siguientes concentraciones en monoterapia: amantadina a 0,00032, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032, 0,1, 0,32, 1, 3,2, 10, 32 y 100 µg/ml; oseltamivir a 0,0001, 0,00032, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032, 0,1, y 0,32, 1,0, 3,2, 10, 32 µg/ml; y ribavirina a 0,00032, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032, 0,1, 0,32, 1, 3,2, 10, 32 y 100 µg/ml µg/ml. En la combinación se analizan seis dosis: amantadina a 0, 0,01, 0,032, 0,1, 0,32, y 1,0 µg/ml; oseltamivir a 0, 0,00032, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032 µg/ml; y ribavirina a 0, 0,032, 0,1, 0,32, 1, y 3,2 µg/ml.

A T = 72 horas, 100 µl del sobrenadante de cada pocillo de las muestras por duplicado se combinan y congelan para
30 analizar la DICT50. En la monocapa celular restante se analiza la viabilidad celular mediante tinción MTS.

Ejemplo 5: Un kit de amantadina clorhidrato de liberación extendida, ribavirina y oseltamivir fosfato

Con referencia a la FIG. 1A, un paquete de tipo blíster (10) de acuerdo con la presente invención está organizado para proporcionar una pluralidad de filas (12), en el que cada fila (12) comprende una pluralidad de dosis (14). En el presente ejemplo, hay dos de estas filas (12), en el que cada una comprende siete dosis, aunque el número de filas o dosis se puede modificar según sea conveniente.
35

Cada dosis comprende una pluralidad de diferentes tipos de forma de dosificación, que están agrupados por tipo en diferentes blíster (20) en cada fila para formar subfilas (18). Un primer tipo de forma de dosificación (A) contiene amantadina, un segundo tipo (B) contiene ribavirina y un tercer tipo (C) contiene oseltamivir. Los diferentes tipos de formas de dosificación para una dosis dada se agrupan de este modo para facilitar el cumplimiento de un régimen de dosificación prescrito. En este ejemplo, una única dosis comprende dos cápsulas de amantadina (A), dos cápsulas de ribavirina (B) y una cápsula de oseltamivir (C), aunque el número de formas de dosificación de cada tipo para cada dosis puede también variar según sea necesario. El paquete de tipo blíster mostrado en la Fig. 1A está configurado para la dosificación BID conveniente de cada uno de los agentes activos durante un periodo de siete días. La paquete de tipo blíster mostrado en la Fig. 1B es el mismo que el que se muestra en la FIG. 1A excepto porque oseltamivir se administra QD.
45

Las cápsulas de amantadina (A) de este ejemplo contienen cada una 125 mg de amantadina clorhidrato en una forma de liberación extendida (p. ej., como se prepara de acuerdo con USSN 11/285.905) y se divulgan en cada uno de los blíster (20) de la primera y la cuarta subfilas (18), aunque cada cápsula puede contener más o menos amantadina o una forma de sal de amantadina diferente, según se desee.

50 Las cápsulas de ribavirina (B) de este ejemplo contienen cada una 200 mg de ribavirina en una forma de liberación inmediata, por ejemplo cápsulas de ribavirina USP (Schering) y están dispuestas en cada una de la segunda y la quinta subfilas (18) de los blíster (20), aunque cada cápsula puede contener más o menos ribavirina, según se desee.

55 Las cápsulas de ribavirina (B) de este ejemplo contienen cada una 75 mg de ribavirina en una forma de liberación inmediata, por ejemplo cápsulas de ribavirina USP (Schering) y están dispuestas en cada una de la segunda y la quinta subfilas (18) de los blíster (20), aunque cada cápsula puede contener más o menos ribavirina, según se desee.

El paquete de tipo blíster también comprende instrucciones que indican una dosis de adulto típica de dos cápsulas de amantadina, dos cápsulas de ribavirina y una cápsula de oseltamivir dos veces al día. Se apreciará que el paquete de tipo blíster de este ejemplo contiene formas de dosificación suficientes para una semana de dosificación, que comprende 28 cápsulas que contienen 125 mg de amantadina clorhidrato, 28 cápsulas que contienen 200 mg de ribavirina y 14 cápsulas que contienen 75 mg de oseltamivir fosfato. Por tanto, el porcentaje relativo de cada agente activo por dosis diaria es 35 % en peso de amantadina clorhidrato, 55 % en peso de ribavirina y 10 % en peso de oseltamivir fosfato.

Ejemplo 6: Un kit de amantadina clorhidrato, ribavirina y oseltamivir fosfato

Un paquete de tipo blíster similar al paquete de tipo blíster del Ejemplo 5 está configurado para proporcionar dos filas (12) de tres subfilas (18) de siete blíster (20) por fila. Dos comprimidos o cápsulas de 100 mg de amantadina clorhidrato (A) en una forma de liberación inmediata, por ejemplo Symmetrel™ (Endo Pharmaceuticals o Novartis) están empaquetados en cada uno de los blíster (20) de la primera y la cuarta subfilas (18). Dos cápsulas de 200 mg de ribavirina en una forma de liberación inmediata, por ejemplo cápsulas de ribavirina USP (Schering) están empaquetadas en cada uno de los blíster (20) de la segunda y la quinta subfilas. Una cápsula de 75 mg de oseltamivir, por ejemplo Tamiflu™ (Roche Pharmaceuticals), está empaquetada en cada uno de los blíster (20) de la tercera y sexta subfilas. El paquete de tipo blíster también comprende instrucciones que indican una dosis de adulto típica de dos comprimidos o cápsulas de amantadina, dos cápsulas de ribavirina y una cápsula de oseltamivir dos veces al día. El paquete de tipo blíster contiene formas de dosificación suficientes para una semana de dosis.

Ejemplo 7: Un kit de amantadina clorhidrato de liberación extendida y ribavirina

Con referencia a la FIG. 2, un paquete de tipo blíster diferente (30) de acuerdo con la presente invención comprende dos filas (32), cada una de las dos subfilas (38) de siete blíster (40) por fila para proporcionar dos filas de siete dosis (34) por fila. Cada dosis (34) comprende dos agentes activos diferentes, amantadina (A) y ribavirina (B), contenidos en diferentes tipos respectivos de forma de dosificación. Cada tipo de forma de dosificación para cada dosis (34) está dispuesto en un blíster aparte (40). Las formas de dosificación de amantadina (A) y ribavirina (B) para cada dosis (34) están agrupadas para facilitar el cumplimiento del régimen de dosificación.

En este ejemplo, cada dosis (34) comprende dos cápsulas de amantadina (A) y dos cápsulas de ribavirina (B). Dos cápsulas (A) de 125 mg de amantadina clorhidrato en una forma de liberación extendida (preparada de acuerdo con USSN 11/285,905) están empaquetadas en cada uno de los blíster (40) de la primera y la tercera subfilas (38). Dos cápsulas de 200 mg de ribavirina (B) en una forma de liberación inmediata, por ejemplo cápsulas de ribavirina USP (Schering) están empaquetadas en cada uno de los blíster (40) de la segunda y la cuarta subfilas.

El paquete de tipo blíster (30) también comprende instrucciones que indican una dosis de adulto típica (34) de dos cápsulas de amantadina de liberación extendida (A) y dos cápsulas de ribavirina (B) dos veces al día (BID). El paquete de tipo blíster contiene formas de dosificación suficientes para una semana de dosis. El kit se puede usar junto con un inhibidor de la neuraminidasa empaquetado por separado, tal como oseltamivir o zanamivir. Por tanto, opcionalmente, dichas instrucciones pueden incluir una instrucción adicional para coadministrar una cápsula de 75 mg de oseltamivir, por ejemplo Tamiflu™ (Roche Pharmaceuticals) (no mostrado) una o dos veces al día junto con las formas de dosificación de amantadina y ribavirina. Opcionalmente, el oseltamivir o el zanamivir se proporciona al sujeto por separado del kit como un medicamento prescrito adicionalmente.

Ejemplo 8: Un kit de amantadina clorhidrato de liberación extendida, ribavirina y oseltamivir

Con referencia a la FIG. 3A, otro kit para administrar una combinación de cloruro de amantadina, ribavirina y oseltamivir comprende un paquete de tipo blíster (50) que define dos filas (52) de blíster, en el que cada fila (52) comprende dos subfilas (58) de siete blíster (60) cada una de las cuales define siete dosis (54) por fila. Las filas (52) agrupan dos tipos diferentes de forma de dosificación (D, E) requeridas para cada dosis (54). Cada dosis (54) comprende una pluralidad de cápsulas de un tipo (D) y una cápsula de otro tipo (E).

En el presente ejemplo hay tres cápsulas de un tipo (D) por dosis, pero menos o más de dichas cápsulas pueden usarse según se requiera. Dichas cápsulas de un tipo (D) comprenden ribavirina y clorhidrato de amantadina, en las que el clorhidrato de amantadina se proporciona en una formulación de liberación extendida y la ribavirina está en una formulación de liberación inmediata, estando las dos formulaciones encapsuladas.

Las cápsulas del otro tipo (E) comprenden oseltamivir y se agrupan con las cápsulas de amantadina-ribavirina (D) para facilitar el cumplimiento de las instrucciones de prescripción. Si se desea se puede usar más de una cápsula del otro tipo (E) por dosis (54). El paquete de tipo blíster (50) de este ejemplo está configurado para dosificación BID de los ingredientes activos durante un periodo de siete días. La paquete de tipo blíster mostrado en la Fig. 3B es el mismo que el que se muestra en la FIG. 3A excepto porque oseltamivir se administra QD.

Ejemplo 9: Un kit de amantadina clorhidrato de liberación extendida, ribavirina y oseltamivir

Un paquete de tipo blíster diferente (70) de acuerdo con la presente invención se muestra en la FIG. 4. Dicho paquete de tipo blíster (70) define dos filas (72) de blíster (80) de un modo similar a los ejemplos 5-8 anteriores. No

obstante, en este ejemplo no hay subfilas, cada fila comprende una única hilera de siete blíster (80), cada uno de dichos blíster aloja una pluralidad de formas de dosificación (F) todas ellas del mismo tipo, de modo que dentro de cada blíster hay formas de dosificación (F) suficientes para formar una única dosis (74).

Cada fila (72) proporciona de este modo siete dosis (74).

- 5 Cada forma de dosificación (F) en este ejemplo comprende amantadina clorhidrato en una forma de liberación extendida, ribavirina y, opcionalmente, oseltamivir.

El paquete de tipo blíster (70) está configurado de este modo para dosificación BID de los agentes activos durante un periodo de siete días. Dicho kit se podría usar solo, especialmente cuando la forma de dosificación comprende amantadina, ribavirina y oseltamivir, o junto con un inhibidor de la neuraminidasa empaquetada por separado, por ejemplo oseltamivir.

10

Ejemplo 10: Estudio de seguridad de múltiples dosis en pacientes con gripe con una combinación de amantadina ER, oseltamivir ER y ribavirina ER.

Los inventores han diseñado el estudio clínico descrito en la Tabla 4 para determinar la seguridad y la farmacocinética de una formulación de combinación de liberación extendida de amantadina y oseltamivir coadministrados con ribavirina IR.

15

Tabla 4

Objetivo	Determinar la seguridad y la farmacocinética de dosis repetidas de fármaco.
Dosificación	La dosificación seleccionada se basa en un estudio previo de dosis única ascendente (DUA): p. ej., 100 mg de amantadina SR + 75 mg de oseltamivir + 400 mg de ribavirina, 100 mg de amantadina SR + 75 mg de oseltamivir + 600 mg de ribavirina, 200 mg de amantadina SR + 75 mg de oseltamivir + 400 mg de ribavirina, 200 mg de amantadina SR + 75 mg de oseltamivir + 600 mg de ribavirina, 200 mg de amantadina SR+ 150 mg de oseltamivir + 600 mg de ribavirina, o 200 mg de amantadina SR + 150 mg de oseltamivir +800 mg de ribavirina, QD durante 7 días
Controles concurrentes	Amantadina IR o amantadina IR más oseltamivir IR (ambas administradas según las indicaciones de los fabricantes)
Vía:	Oral
Población de sujetos:	Hombres o mujeres con diagnóstico de gripe
Estructura:	4 ramas
Centros de estudio:	TBD
Enmascaramiento:	Pacientes enmascarados
Procedimiento de asignación de sujetos:	Aleatorio, con un número igual de varones y mujeres en cada grupo y distribuciones de la misma edad dentro de los grupos
Tamaño total de la muestra:	24 sujetos, 6 por tama de dosificación
Criterio de principal de valoración de la eficacia:	Ninguno
Acontecimientos adversos:	Monitorizados al menos dos veces al día según los efectos sobre el comportamiento, cardiovasculares y gastrointestinales notificados para dosis altas de amantadina u oseltamivir (incluyendo mareos, dolor de cabeza, confusión, estreñimiento, hipertensión, tos, náuseas, diarrea, vómitos).
Obtención de sangre	Mediante cánula durante el primer día del periodo de estudio, después 2-4 veces el resto del estudio
Análisis	Ensayos para medir los acontecimientos adversos de amantadina, oseltamivir, ribavirina y potencialmente otros parámetros fisiológicos

Ejemplo 11: Ensayo clínico de fase 2 de la seguridad y la eficacia de la combinación triple intravenosa de terapia farmacológica antiviral para el tratamiento de la gripe aviar grave

5 Los inventores han diseñado este estudio para: 1) evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la combinación triple i-v de terapia farmacológica antiviral (TCAD) en el tratamiento de pacientes con gripe aviar grave; 2) evaluar el índice y extensión de la eficacia antiviral de TCAD durante el curso del tratamiento evaluado mediante detección por reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR) negativa del ácido ribonucleico viral (ARN) en el tracto respiratorio superior e inferior, el tracto gastrointestinal (heces) y sangre (viremia), nariz y garganta; y 3) evaluar la tasa y la extensión de la resistencia al fármaco antiviral a TCAD durante el curso del tratamiento mediante pirosecuenciación (o equivalente).

10 Tamaño del estudio: 12 pacientes

15 Criterios de inclusión 1) edad ≥ 1 año; 2) fiebre $\geq 38,0$ °C; 3) al menos un síntoma respiratorio: tos, disnea (falta de aliento) y/o dolor de garganta; 4) enfermedad (inicio de fiebre, síntomas respiratorios o síntomas constitucionales) comenzaron en los últimos 7 días; y 5) pruebas del riesgo epidemiológico de la gripe aviar como se define al cumplir uno de los criterios siguientes en un plazo de 14 días antes del momento del inicio de la enfermedad: (a) Había aves muertas o enfermas en los pueblos o barrios de los sujetos (en un radio de 2 km); (b) el sujeto ha tenido contacto directo con aves o pollos (aves o pollos sanos o enfermos); (c) el sujeto ha tenido contacto directo con alguien con sospecha de gripe aviar o confirmada; o (d) el sujeto posiblemente ha estado expuesto al virus H5N1.

20 Criterios de exclusión 1) Antecedentes de alergia o intolerancia grave (estimado por el investigador) al clorhidrato de amantadina, zanamivir y/o ribavirina, y o a cualquier componente de estos productos farmacológicos; y 2) explicación alternativa para los síntomas clínicos del paciente (es decir, aparte de los de la gripe) determinado por el investigador con la información disponible inmediatamente.

25 Criterios de detección selectiva 1) Las muestras siguientes se analizarán mediante RT-PCR cuantitativa para H5, no obstante, la decisión de iniciar terapia TCAD no depende de la recepción de los resultados de estas pruebas: Exudado nasal x 2; exudado orofaríngeo (de garganta) x 2; aspirado nasofaríngeo (NPA; dado que el NPA es una prueba obstructiva para algunos sujetos, el NPA se puede omitir o el lavado nasal puede sustituir al NPA según el criterio del investigador); lavado broncoalveolar (LBA) o aspirado del tubo endotraqueal; muestra de sangre (para viremia, CBC y química en suero); y prueba de embarazo en orina para mujeres ≥ 12 años de edad.

30 Régimen de dosificación de TCAD: La duración del tratamiento será de un mínimo de 5 días, pero se puede extender según determine el médico en base a la evaluación de beneficios/riesgos para cada paciente individual. Un kit para 5 días de tratamiento contiene: 1) 10 viales que contienen ~4 ml de 100 mg/ml de amantadina en agua con o sin tampón, 2) 10 viales que contienen 15 ml de 75 mg/ml de ribavirina en agua con o sin tampón y 3) 10 viales de ~7 ml de 10 mg/ml de zanamivir en agua con o sin tampón o, como alternativa al zanamivir, 10 viales de oseltamivir liofilizado.

35 Para el tratamiento, se extraen 3,3 ml de un vial de amantadina en una jeringuilla y se inyectan en una bolsa de infusión de 500 ml de 0,9 % o 5 % de dextrosa/0,45 % de solución salina que producen una concentración de 0,66 mg/ml de amantadina; la velocidad del volumen de infusión se fija a 40 ml/min, que tiene como resultado una velocidad de la dosis de infusión de 26 mg/hora (630 mg/día). Se extraen 13,5 ml de un vial de ribavirina en una jeringuilla y se inyectan en una bolsa de infusión de 500 ml de solución salina que producen una concentración de 2,03 mg/ml de ribavirina; la velocidad del volumen de infusión se fija a 40 ml/min, que tiene como resultado una velocidad de la dosis de infusión de 84,6 mg/hora (2.030 mg/día). Se extraen 6,5 ml de zanamivir en una jeringuilla y se inyectan en una bolsa de infusión de 500 ml de solución salina que producen una concentración de 0,13 mg/ml de zanamivir; la velocidad del volumen de infusión se fija a 40 ml/min, que tiene como resultado una velocidad de la dosis de infusión de 5,3 mg/hora (127 mg/día). Como alternativa al zanamivir, se extraen 5 ml de un vial de ribavirina en una jeringuilla y se inyectan en un vial de oseltamivir liofilizado para reconstituir el polvo estéril y se produce una concentración de 46 mg/ml de oseltamivir/ fosfato; la velocidad del volumen de infusión se fija a 40 ml/min, que tiene como resultado una velocidad de la dosis de infusión de 18,4 mg/hora (442 mg/día). A estas velocidades de infusión se tienen que preparar nuevas bolsas del agente antiviral cada 12 horas.

45 Seguridad: Se monitorizarán los acontecimientos adversos. La Tabla para la Clasificación de la gravedad de los acontecimientos adversos adultos y pediátricos de la División de SIDA del NIH (Tabla de clasificación de los AA de DAIDS) se usará para avaluar la gravedad de un acontecimiento adverso.

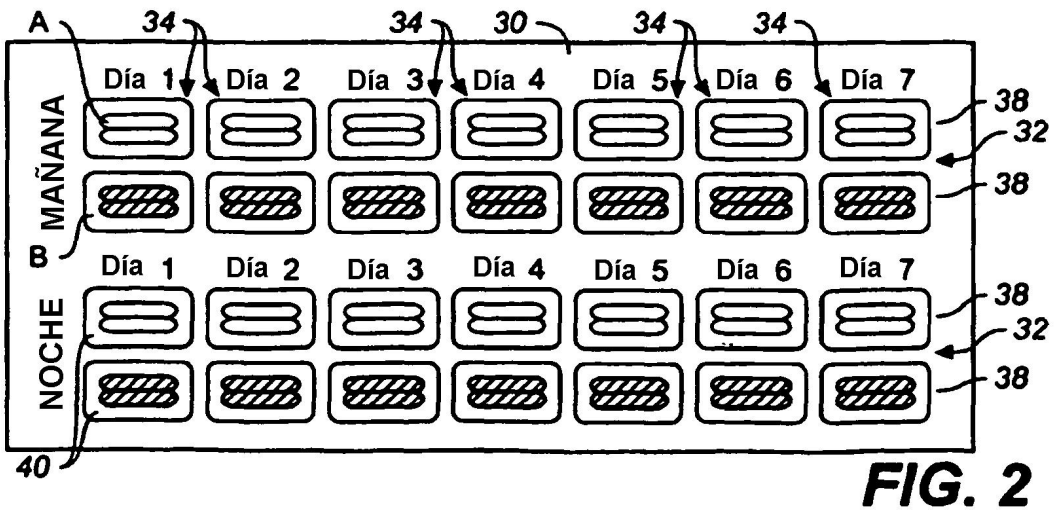
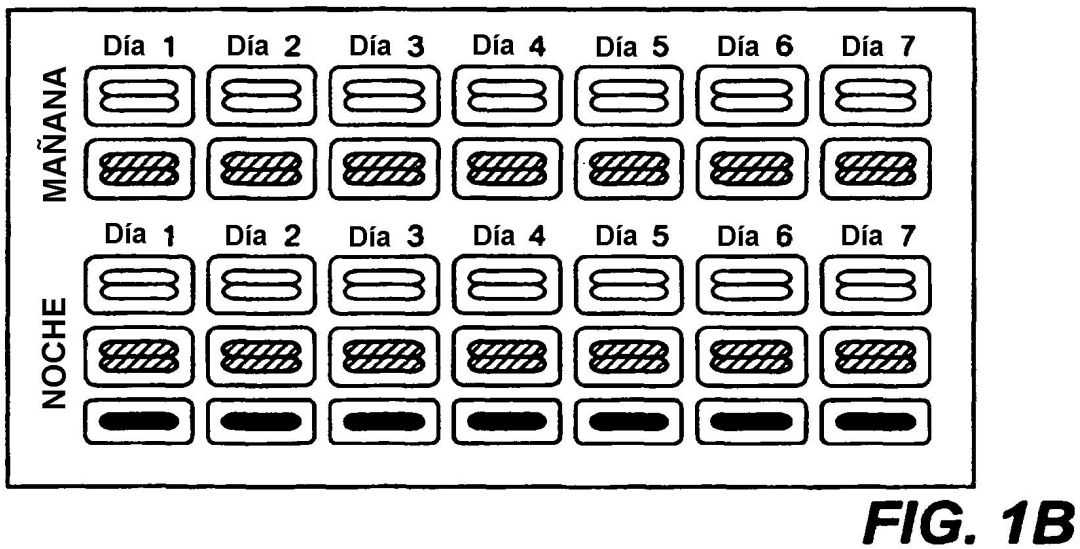
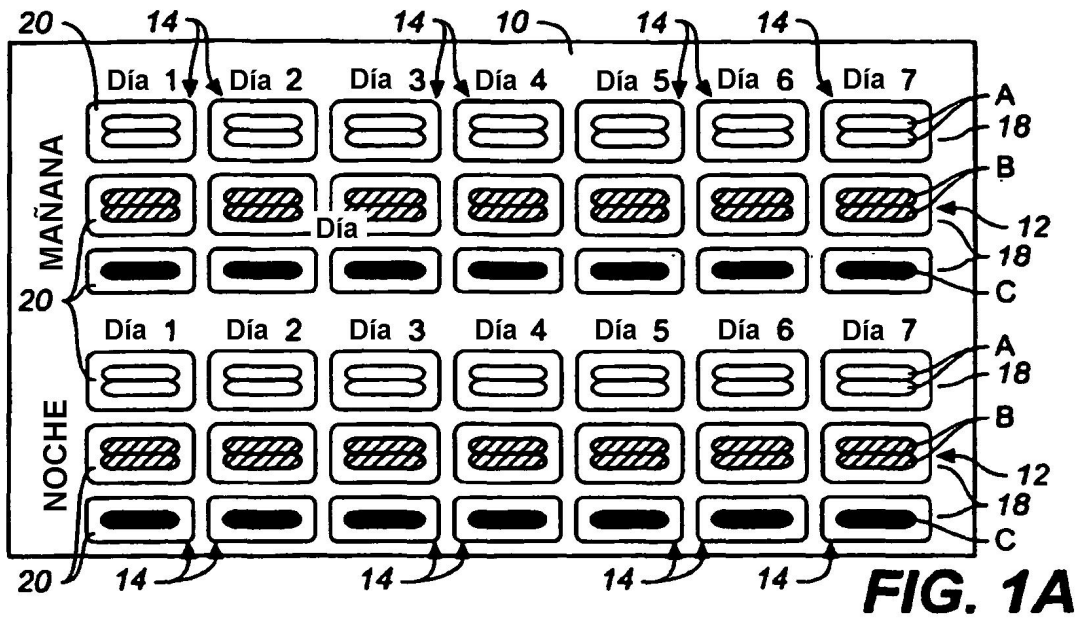
50 Evaluaciones clínicas: Las evaluaciones clínicas incluyen: Mortalidad intrahospitalaria; el índice y la extensión de la insuficiencia clínica durante el tratamiento [fallo clínico se define como muerte, taquipnea grave (frecuencia respiratoria ≥ 30 para edades ≥ 12 años de edad, frecuencia ≥ 40 para edades de 6 a 12 años de edad, frecuencia ≥ 45 para edades de 3 a 6 años, frecuencia ≥ 50 para edades de 1 a 3 años), disnea grave (incapaz de formar frases completas o uso de músculos respiratorios accesorios); saturación de oxígeno arterial < 92 % en aire ambiente mediante el procedimiento transcutáneo; necesidad de ventilación mecánica o ingreso en la UCI]; mortalidad a 28

5 días para los sujetos; mortalidad a 180 días para los sujetos; uso de ventilación mecánica en algún momento para los sujetos; número de ingresos en la UCI para sujetos con gripe aviar; desarrollo de síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) en algún momento para los sujetos; duración de hospitalización para los sujetos; duración de los síntomas tal como se definen por el tiempo hasta la ausencia de fiebre, ningún síntoma o síntomas mínimos, ausencia de necesidad de medicación de alivio y continuación de la actividad normal.

10 Criterios de valoración virológicos: Las evaluaciones virológicas incluyen: Tasa y extensión de la carga y la diseminación viral durante el curso del tratamiento evaluado mediante RT-PCR negativa para ARN viral en exudados de nariz y de garganta, muestras de sangre, LNA y LBA; la tasa y extensión de la aparición de resistencia a los fármacos antivirales amantadina o zanamivir determinado mediante pirosecuenciación; y caracterización genética de las variantes resistentes.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende: 10 - 60 por ciento en peso (%) p de amantadina, 30-80 % en peso de ribavirina y 0,5-30 % en peso de oseltamivir, en la que los porcentajes en peso se basan en el peso total de los agentes activos en la composición.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1 en una forma para administración intravenosa.
3. La composición de la reivindicación 1 en una forma de dosificación unitaria para administración oral.
4. La composición de la reivindicación 3, que comprende 25-125 mg de amantadina y 50-200 mg de ribavirina.
5. La composición de la reivindicación 3, que comprende al menos 125 mg de amantadina en una forma de liberación extendida y menos de 200 mg de ribavirina.
- 10 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la amantadina está en forma de liberación extendida.
7. La composición de la reivindicación 1 en un polvo liofilizado en un vial.
8. La composición de la reivindicación 1 en una forma de líquido estéril en un vial.
9. Amantadina, ribavirina y oseltamivir para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe.
- 15 10. Amantadina para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe, que comprende administrar amantadina, ribavirina y oseltamivir.
11. Ribavirina para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe, que comprende administrar amantadina, ribavirina y oseltamivir.
12. Oseltamivir para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe, que comprende administrar amantadina, ribavirina y oseltamivir.
- 20 13. Amantadina y ribavirina para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o profilaxis de la gripe, que comprende administrar amantadina, ribavirina y oseltamivir.
14. La composición de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento y/o profilaxis de la infección de la gripe.
15. Un kit para su uso en el tratamiento o profilaxis de la gripe en un paciente, comprendiendo dicho kit amantadina, ribavirina y oseltamivir.
- 25 16. El kit de la reivindicación 15 para tratamiento o profilaxis oral, en el que dicho kit comprende: una pluralidad de formas de dosificación, en la que dicha pluralidad que constituye una o más dosis, comprendiendo cada dosis una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una combinación de ribavirina y amantadina.
17. El kit de la reivindicación 15, en el que la amantadina y la ribavirina se formulan como formas de dosificación separadas.
- 30 18. El kit de la reivindicación 15, en el que la amantadina y la ribavirina se formulan conjuntamente como formas de dosificación únicas.
19. El kit de la reivindicación 15, en el que la amantadina, la ribavirina y el oseltamivir están en una forma para administración intravenosa.



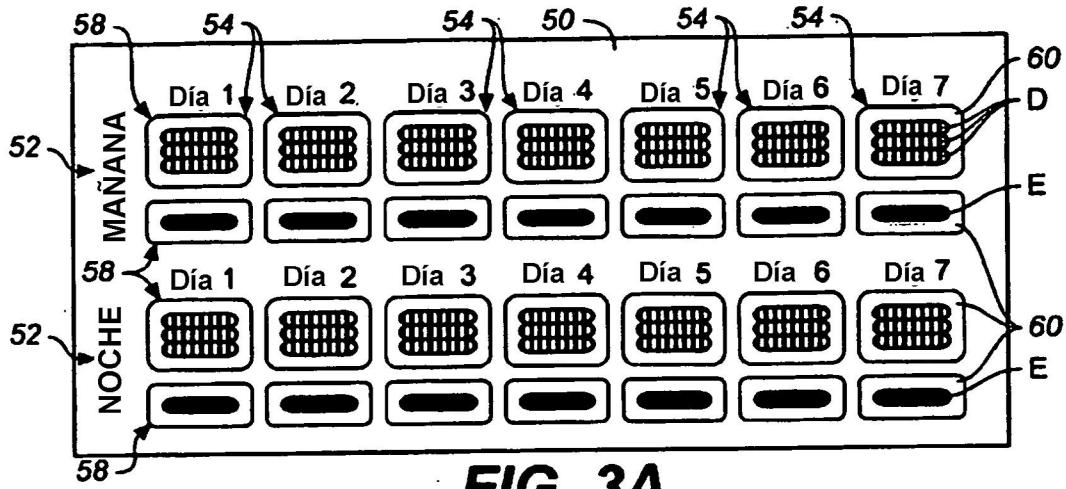


FIG. 3A

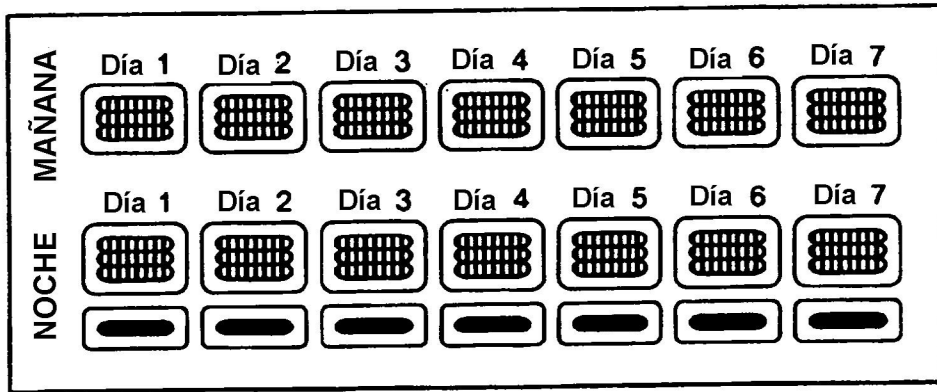


FIG. 3B

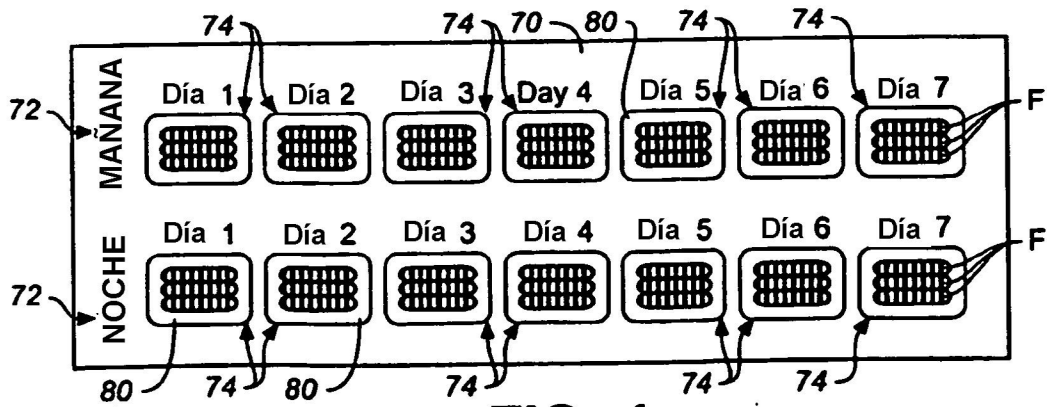


FIG. 4

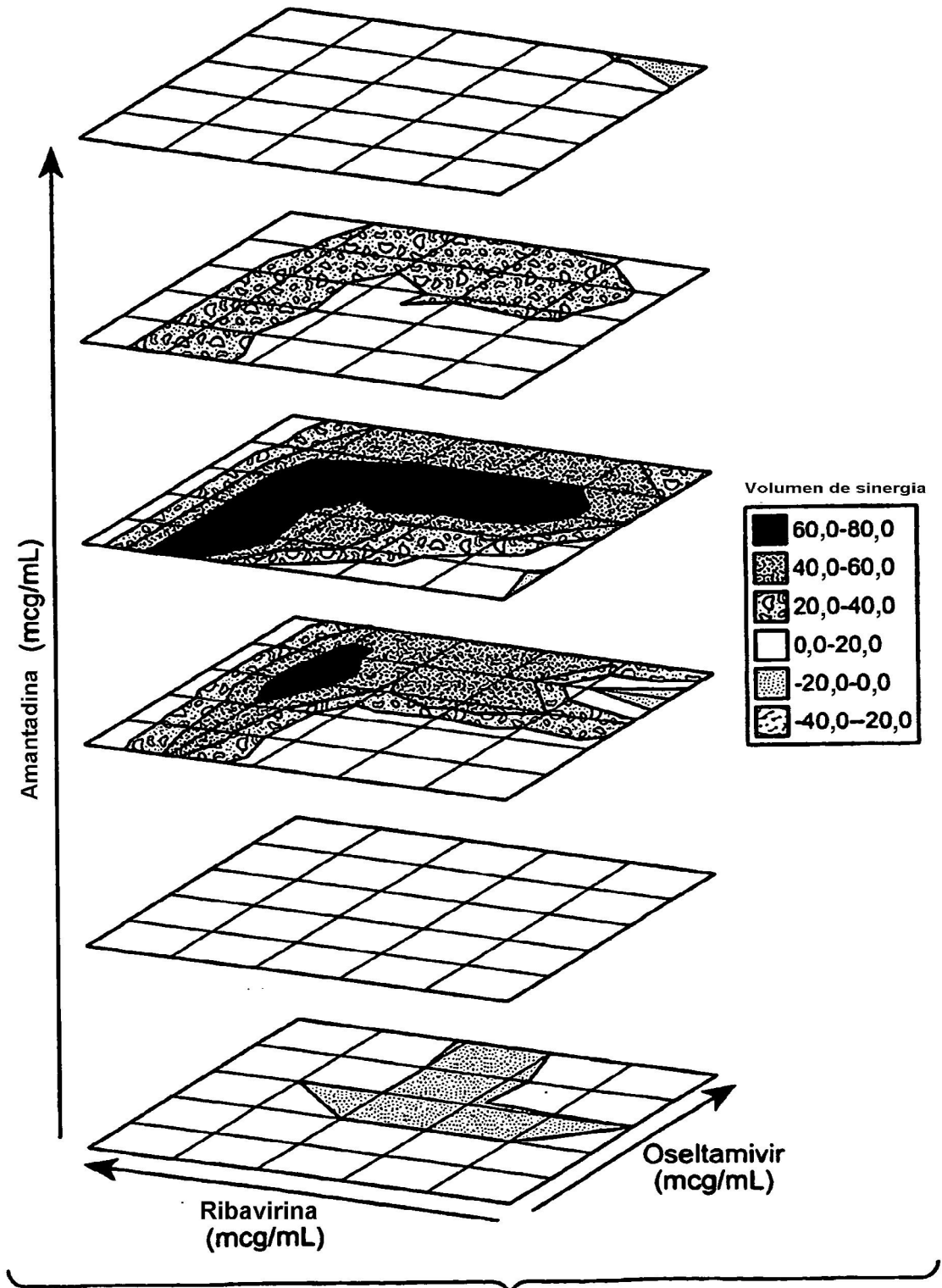


FIG. 5