

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 379**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 9/12** (2006.01)

**A61P 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09701974 .9**

96 Fecha de presentación: **14.01.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2249866**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2010**

54

Título: **Uso de una sal de ácido acetilsalicílico para el tratamiento de infecciones víricas**

30

Prioridad:

**14.01.2008 DE 102008004386**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

**10.12.2012**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**10.12.2012**

73

Titular/es:

**ACTIVAERO GMBH (100.0%)  
Wohraer Strasse 37  
35285 Gemünden, DE**

72

Inventor/es:

**LUDWIG, STEPHAN;  
SCHEUCH, GERHARD y  
PLANZ, OLIVER**

74

Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 392 379 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

Uso de una sal de ácido acetilsalicílico para el tratamiento de infecciones víricas

### Campo de la invención

5 La invención se refiere a una composición nueva que contiene una sal de ácido o-acetilsalicílico con un aminoácido básico para su uso en la prevención y el tratamiento de infecciones víricas de seres humanos y animales.

### Estado de la técnica y antecedentes de la invención

10 La gripe pertenece, tanto ahora como antes, a las mayores epidemias con potencial pandémico de la humanidad. Hay solamente unos pocos fármacos contra los patógenos inductores, los virus de la gripe A, que están todos dirigidos directamente contra el virus. A este respecto, el problema es que se pueden desarrollar resistencias de manera relativamente rápida. Además, hay riesgo de que la gripe aviar que se extiende epidémicamente en aves, inducida por infecciones por el virus de la gripe A H5, pueda transmitirse también a seres humanos. En particular, las personas que entran en contacto con aves infectadas están, por consiguiente, en alto riesgo. En particular, debe indicarse en este punto que se ha informado del aumento de insensibilidades del virus de H5N1 contra los pocos medicamentos aprobados tales como oseltamivir. Por consiguiente, existe la necesidad urgente de medicamentos  
15 contra la gripe nuevos y eficaces para la prevención y también el tratamiento de infecciones víricas, no debiendo desencadenar los medicamentos en lo posible ninguna resistencia.

20 Por el documento WO2004/060360 A1 se sabe que el ácido acetilsalicílico puede inhibir el factor de transcripción NF-κB en células huésped y que en esta inhibición de la ruta de señal de NF-κB permanecerán en el núcleo de la célula componentes víricos esenciales y ya no pueden ser introducidos en partículas víricas. Por esta referencia bibliográfica se conoce también la administración aerógena de ácido acetilsalicílico para la prevención o el tratamiento de infecciones víricas.

25 Por ejemplo, el documento DE 102 02 019 A1, se conocen sales del ácido acetilsalicílico con aminoácidos básicos, estando preparadas las preparaciones obtenidas con los mismos exclusivamente para la administración oral. Por esta referencia bibliográfica se conoce además el uso de dichas sales para el tratamiento de enfermedades de tipo reumático, artritis, neuralgias, mialgias, migraña, cardiopatías isquémicas, apopleja, angina de pecho, infarto de miocardio, operaciones de derivación, PTCA, implante de prótesis endovascular, para la estimulación del sistema inmunitario de pacientes con VIH, para la prevención de tumores, para el retardo del deterioro cognitivo por el síndrome de demencia, para la inhibición de formación de cálculos biliares y/o el tratamiento de enfermedades diabéticas. Las sales ya conocidas en este sentido se usan ya además con la denominación comercial Aspisol®  
30 como medicamentos para el tratamiento de asma, fiebre de heno, inflamación de la mucosa nasal o infecciones crónicas de las vías respiratorias y, concretamente, además de la administración oral también para inyección. Todas estas enfermedades son enfermedades que no tienen una relación directa con infecciones víricas provocadas por virus de la gripe.

35 El uso del ácido acetilsalicílico puro como agente antiviral, que se administra por inhalación como aerosol al sistema respiratorio o a los pulmones, ha dado básicamente muy buen resultado en modelos animales. No obstante, en seres humanos, la inhalación de ácido acetilsalicílico puro puede provocar irritaciones fuertes del sistema respiratorio. Además, en casos individuales, se ha demostrado que la inhalación de ácido acetilsalicílico puede provocar ataques de asma en algunos pacientes sensibles. En cualquier caso, una administración aerógena de ácido acetilsalicílico como medicamento contra la gripe estaría, por consiguiente, contraindicada para pacientes con asma o personas con riesgo de padecer asma.  
40

### Problema técnico de la invención

Por consiguiente, el problema técnico de la invención se basa en proporcionar una formulación con ácido acetilsalicílico para su uso en el tratamiento de infecciones víricas, que sea particularmente bien tolerada y en particular evite eficazmente el riesgo de la inducción de ataques de asma.

### 45 Rasgos fundamentales de la invención y formas de realización preferentes

Para solucionar este problema técnico, la invención da a conocer una composición que contiene una dosis fisiológicamente eficaz de una sal del ácido o-acetilsalicílico con un aminoácido básico natural o no natural para su uso para la prevención o el tratamiento de infecciones víricas de seres humanos o de animales, en particular de mamíferos y aves. En el marco de la invención, en particular, las infecciones por virus de tipo silvestre de origen natural, pero no las infecciones por virus genéticamente modificados, se denominan infecciones víricas.  
50

Entre las aves, se consideran para la prevención y el tratamiento, en particular, aves tales como gallinas, gansos, patos, gallinas pularadas, pavos domésticos, pavos silvestres, codornices o palomas, pero también aves cantoras.

Mediante el uso de una sal de este tipo, en particular en el caso de administración aerógena, se evita una irritación del tejido, por ejemplo, de la mucosa de las vías respiratorias, porque el principio activo en la formulación

administrada no es ácido. Con ello se evitan eficazmente, en particular, ataques de asma en pacientes afectados con asma o personas en riesgo de padecerlo y no hay prácticamente ningún inconveniente para la administración amplia como agente terapéutico, como también como agente profiláctico, debido a la ausencia del riesgo de efectos secundarios, sobre todo porque la formulación ya se usa incluso como agente contra el asma. Además, tal como se ha encontrado en el marco de la invención, mediante la derivación del ácido acetilsalicílico, la inhibición de la replicación vírica no se ve prácticamente debilitada, lo que no era de esperar; sorprendentemente, incluso se ve parcialmente aumentada ligeramente.

Según la invención el aminoácido básico se selecciona del grupo que consta de "lisina, arginina, ornitina, ácido diaminobutírico y mezclas de dichos aminoácidos", tratándose preferentemente de un monoacetilsalicilato. Un aminoácido es un ácido alfa-aminocarboxílico, pudiendo estar en el átomo alfa un hidrógeno o un resto discrecional unido como cadena lateral. Un aminoácido básico contiene en la cadena lateral un grupo básico o varios grupos básicos, en particular un grupo amino. El aminoácido básico puede ser en particular D-lisina, L-lisina o una mezcla de D-lisina y L-lisina.

La composición contiene adicionalmente una sal del ácido o-acetilsalicílico con glicina. La relación en peso de lisina con respecto a glicina en la composición puede encontrarse, a este respecto, en el intervalo de 100:1 a 1:1, en particular de 100:1 a 10:1. Es preferente una mezcla de sales de los aminoácidos lisina y glicina. De modo particularmente preferente está contenida una sal o una mezcla de sales, tal como en la composición disponible comercialmente con la denominación comercial Aspisol®, por ejemplo, en solución acuosa.

En el marco de la invención, también pueden usarse composiciones farmacéuticas que contienen profármacos, que son metabolizados de modo natural por el organismo después de la toma o administración dando principios activos que se usan según la invención.

La composición según la invención puede usarse para la prevención o el tratamiento de una pluralidad de infecciones víricas. Particularmente adecuada es la composición para la profilaxis o el tratamiento de infecciones por virus ARN de cadena negativa, tales como virus de la gripe, preferentemente virus de la gripe A, en particular virus del tipo H5 o H7.

Sin embargo, también se ha encontrado que la sustancia usada según la invención suprime la sobreexpresión de citoquinas inducida por virus ("tormenta de citoquinas"), que están reguladas en función de NF- $\kappa$ B. Por medio de la sustancia según la invención, por consiguiente, puede reducirse, en general, la patogenicidad de muchos virus cuyo potencial patógeno, entre otras cosas, está relacionado con una sobreexpresión de citoquinas. Por consiguiente, la composición usada según la invención también es adecuada para el tratamiento y la prevención de infecciones víricas por coronavirus (SARS), virus sincitial respiratorio (RSV), filovirus tales como virus de Marburg o virus de ébola, arenavirus tales como virus de Lassa, virus de fiebre hemorrágica argentina, boliviana o venezolana, hantavirus, flavivirus tales como virus de dengue o virus de fiebre amarilla, virus de fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, virus de fiebre del Valle del Rift, virus de parainfluenza (tipo 1, 2 y 3), rinovirus, metapneumovirus humano (hMPV) y virus de Epstein Barr.

La preparación galénica de una composición farmacéutica usada según la invención puede realizarse de una manera habitual en este campo y básicamente para una administración discrecional, por ejemplo, oralmente, para la inyección o aerógenamente para inhalación. Formas de preparación galénicas sólidas o líquidas apropiadas son, por ejemplo, granulados, polvos, grageas, comprimidos, (micro)cápsulas, supositorios, jarabes, zumos, suspensiones, emulsiones, gotas o soluciones para inyección (i.v., i.p., i.m., s.c.) o dispersiones finas (aerosoles), sistemas transdérmicos y preparados de liberación prolongada del principio activo, en cuya fabricación se usan los coadyuvantes habituales, tales como vehículos, disgregantes, aglutinantes, agentes de recubrimiento, agentes de hinchamiento, deslizantes o lubricantes, agentes saborizantes, edulcorantes y solubilizantes. Como coadyuvantes se pueden mencionar carbonato de magnesio, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros sacáridos, talco, proteína láctea, gelatina, almidón, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales tales como aceite de hígado de bacalao, aceite de girasol, aceite de cacahuete o aceite de sésamo, polietilenglicoles y disolventes tales como agua estéril y alcoholes mono- y polihidroxílicos, por ejemplo glicerina, o mezclas de dichos disolventes. Una composición farmacéutica que se usa según la invención puede fabricarse mezclando al menos una sal usada según la invención en una dosis definida con un vehículo farmacéuticamente apropiado y fisiológicamente aceptable y, dado el caso, otros principios activos o coadyuvantes adecuados con dosis definidas y preparándose la forma de administración deseada. Ejemplos de preparaciones adecuadas para la administración oral se pueden encontrar, por ejemplo, en la referencia bibliográfica DE 102 02 019 A1 y las referencias bibliográficas citadas en la misma.

Es preferente, de todas las maneras, la preparación galénica para la administración aerógena, nasal en forma de composición líquida acuosa (solución), o en forma de polvo, dado el caso en suspensión en un diluyente, por ejemplo, un diluyente que puede licuarse a temperatura ambiente tal como CFC, hidrofluoroalcanos tales como 1,1,1,2-tetrafluoroetano o 1,1,1,2,3,3,3,3-heptafluoropropano, propano, butano, isobutano u otros diluyentes habituales en el campo de las formulaciones medicinales en aerosol. Además de los diluyentes mencionados o en su lugar, puede usarse también aire, oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono u óxido nitroso. A este respecto, la composición puede contener los aditivos y coadyuvantes habituales en el campo de las formulaciones medicinales en aerosol tales como por ejemplo, sustancias tensoactivas fisiológicamente aceptables y/o coadyuvantes de

suspensión convencionales.

La composición acuosa, además, es preferentemente una solución acuosa 0,01 mM a 3,0 M, preferentemente 0,5 a 3,0 M o 0,01 a 100 mM, en particular 0,1 a 10 mM de la sal o de la mezcla de sales.

5 Es preferente que el tamaño de partícula de los aerosoles, ya sea la solución, ya sea la sal como material sólido o en suspensión, tenga un valor de MMAD (diámetro aerodinámico promedio en masa) inferior a 10  $\mu\text{m}$ , preferiblemente inferior a 5  $\mu\text{m}$ . Para la medición de la distribución del tamaño de partícula aerodinámico FPD (dosis de partícula fina) o FPF (fracción de partículas finas), son adecuados dispositivos impactadores tales como, por ejemplo, el borboteador de líquidos de varias etapas de 5 etapas (MSLI) o el impactador en cascada Andersen de 8 etapas (ACI), que se describen en el Capítulo 601 de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) o en la Monografía de Inhalanda de la Farmacopea Europea (Ph. Eur.). En base a la distribución de partículas aerodinámica, el valor de MMAD de una preparación en aerosol puede calcularse por medio de un "gráfico de probabilidad logarítmica". Con los valores de MMAD preferentes se logra que las partículas en aerosol sean respirables y, concretamente, lleguen hasta la parte profunda del pulmón, de tal manera que se obtenga una concentración suficiente en todo el pulmón en caso de una duración habitual de la administración. Con el fin de impedir que sean exhaladas de nuevo partículas pequeñas, puede estar previsto como límite inferior para el valor de MMAD de 0,1  $\mu\text{m}$ , preferentemente de 0,5  $\mu\text{m}$ , del modo más preferente de 1  $\mu\text{m}$ .

La sal usada según la invención puede triturarse o micronizarse de manera convencional para lograr los valores de MMAD deseados, por ejemplo, por medio de molinos de clavijas, de bolas o de chorro de aire.

20 La administración de un aerosol según la invención se puede realizar con todos los dispositivos de inhalación con generadores de aerosol, tales como pulverizadores o nebulizadores, que son habituales en la técnica médica. Ejemplos son pulverizadores de polvo-aerosol o DPI (inhaladores de polvo seco), nebulizadores de boquillas, ultrasonidos o de membrana oscilante. También se pueden usar generadores de aerosol que funcionan sobre la base del principio electrohidrodinámico o aerosoles de condensación de formulación líquida. Ejemplos para dispositivos de inhalación adecuados se describen en las referencias bibliográfica EP 1741460 A, EP 1700614 A, EP 25 125864 A y EP 1163921 A.

La concentración de la sal en la composición en relación con la tasa de rendimiento de un generador de aerosol usado se seleccionaron la condición de que al menos 10 mg, preferentemente al menos 50 mg, del modo más preferente al menos 100 mg de la sal se transformen al aerosol y se administren a un paciente en un periodo inferior a cinco minutos, preferentemente dos minutos, del modo más preferente un minuto.

30 Además, es útil para una deposición óptima en el pulmón que se controle y ajuste el flujo de inspiración o el volumen de inspiración. Puesto que con un flujo de inhalación demasiado rápido las partículas en aerosol ya chocan contra el fondo faríngeo o son separadas en la glotis. Si la respiración es demasiado superficial, las partículas en aerosol solamente alcanzan el sistema respiratorio superior y no las regiones profundas del pulmón. Un sistema de inhalación usado debería asegurar, por consiguiente, una inhalación profunda, lenta, por parte del paciente. Para niños, el volumen de inhalación debería ser de al menos 200 ml, preferentemente de al menos 500 ml. Para adultos, el volumen de inhalación debería ser de al menos 300 ml, preferentemente de al menos 500 ml. Apropiadamente, una inhalación de tal volumen en aerosol se realiza en un periodo de al menos un segundo, mejor al menos tres segundos, preferentemente al menos cinco segundos. El flujo de inhalación se ajusta ventajosamente a menos de 1000 ml/s, en particular menos de 500 ml/s, en particular menos de 300 ml/s y el volumen de respiración a al menos el 20 %, en particular al menos el 30 %, preferentemente al menos el 50 %, hasta el 95%, con respecto a la capacidad de inspiración del paciente. Esto último asegura por una parte una inhalación lenta, pero por otra parte también una inhalación profunda por parte del paciente.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición para su uso según las reivindicaciones 1 a 9.

45 En el marco de la invención, se pueden usar sistemas de inhalación que registran los parámetros anteriores usando técnicas de medición por medio de sensores y que informan sobre la inhalación apropiada o no apropiada por medio de señales eléctricas, acústicas y/u ópticas. Con respecto a dispositivos de inhalación que operan de esta manera, se hace referencia adicional a las referencias bibliográficas anteriores. En el caso de sistemas de inhalación sencillos, también puede estar previsto que se incluya una hoja de información al paciente con las medidas mencionadas a la composición farmacéutica.

50 Por consiguiente, la invención se refiere también a una formulación en aerosol que contiene una composición según la reivindicación 1 a 5, un diluyente y opcionalmente coadyuvantes y/o vehículos. La sal puede estar contenida en una cantidad del 0,001 al 50 % en peso, del 0,001 al 10 % en peso, en particular del 0,1 al 10 % en peso, o del 10 % al 50 % en peso, en particular del 30 al 50 % en peso, con respecto a la totalidad de la formulación. Si la sal está presente en forma de partículas, puede estar contenida con un valor de MMAD inferior a 10  $\mu\text{m}$ , en particular inferior a 5  $\mu\text{m}$ .

A este respecto, es sorprendente, en particular cuando se usan las altas concentraciones mencionadas anteriormente, que las partículas de aerosol que se forman a partir de dichas soluciones puedan ser producidas con el tamaño de partícula pequeño indicado anteriormente.

Además, la invención también divulga el uso de una formulación en aerosol según la invención para la prevención o el tratamiento de infecciones víricas de seres humanos o animales, administrándose a un ser humano, que está en riesgo de enfermar por una infección viral o está afectado por la misma, o dicho animal, aerógenamente para la inhalación por medio de la nariz o la boca una cantidad fisiológicamente eficaz de la formulación en aerosol.

- 5 Finalmente, la invención divulga un dispositivo de inhalación con un depósito de almacenamiento y un generador de aerosol conectado al depósito de almacenamiento, conteniendo el depósito de almacenamiento una formulación en aerosol según la invención. A la salida del generador de aerosol está conectada habitualmente una boquilla. Además, puede estar prevista una bomba de aire, por medio de la cual, controlando mediante un dispositivo de control se controla el flujo de inhalación y/o el volumen de inhalación. Pueden estar previstos medios de control y/o regulación para el control y/o regulación del flujo de inhalación y del volumen de respiración, ajustándose los medios de control y/o regulación preferentemente a los valores mencionados anteriormente.

Las explicaciones anteriores para la formulación farmacéutica según la invención se aplican de manera análoga también a la formulación en aerosol según la invención, al uso de la misma y al dispositivo de inhalación.

A continuación, la invención se explicará con más detalle mediante los ejemplos.

#### 15 **Ejemplo 1:** Análisis de fenómenos de resistencia

Puesto que particularmente deben tratarse los problemas de resistencia con ácido acetilsalicílico como un inhibidor de acción antivírica de factores celulares, se analizó la tendencia a la formación de variantes de resistencia en comparación con los fármacos amantadina y oseltamivir que actúan directamente sobre el virus. Se infectaron células epiteliales de pulmón A549 con el aislado del virus de gripe A aviar altamente patógeno A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (FPV, virus de peste aviar) con una MOI = 0,01 (multiplicidad de infección) y se infectaron durante otras 24 horas en presencia o ausencia de ácido acetilsalicílico (5 mM), amantadina (5  $\mu$ M) y oseltamivir (2  $\mu$ M). En una preparación aparte, se infectaron células epiteliales de pulmón A549 con A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) con una MOI = 0,001 y se incubaron durante otras 24 horas en presencia o ausencia de lisina-glicina-acetilsalicilato (5 mM) y oseltamivir (2  $\mu$ M). En ambas preparaciones se recogió después el sobrenadante celular de cada muestra y se determinó la valoración de virus en el ensayo de placa de células MDCK. Luego los sobrenadantes se normalizaron y se usaron de nuevo para infectar con el mismo número de virus en cada caso un segundo pasaje celular tratado o sin tratar en las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió en total hasta el quinto u octavo pasaje.

En la Figura 1A se registraron gráficamente las valoraciones de virus de células tratadas con ácido acetilsalicílico o amantadina u oseltamivir en comparación con las valoraciones de los sobrenadantes de células sin tratar. Se puede ver en el tercer pasaje ya que las valoraciones de virus de células tratadas con amantadina aumentan de nuevo significativamente debido a la formación de variantes resistentes. Sorprendentemente, esto también se encuentra en una medida comparable en las condiciones experimentales elegidas en el presente documento para oseltamivir. En un claro contraste con los mismos, se encuentra que el ácido acetilsalicílico tiene aun en el quinto pasaje todavía la misma actividad antivírica no alterada que en el primer pasaje.

En la Figura 1B se registraron gráficamente las valoraciones de virus de células tratadas con lisina-glicina-acetilsalicilato u oseltamivir en comparación con los sobrenadantes de células sin tratar. El resultado descrito en la Figura 1A se muestra también para lisina-glicina-acetilsalicilato, no pudiendo detectarse ya después de ocho pasos ninguna formación de resistencia vírica después del tratamiento con lisina-glicina-acetilsalicilato. Los resultados obtenidos son apropiados en toda su extensión para hacer la declaración de que tanto el ácido acetilsalicílico como también el lisina-glicina-acetilsalicilato no tienen ninguna tendencia a la formación de variantes de resistencia en cultivo celular.

#### **Ejemplo 2:** Análisis de la formulación lisina-glicina-acetilsalicilato sobre su actividad antivírica contra virus de gripe A altamente patógenos

La composición analizada es Lys-Gly-acetilsalicilato (en adelante también denominada LG-acetilsalicilato), que corresponde a la composición molecular del producto Aspisol®, disponible de Bayer AG.

Esta formulación se sometió a la serie de análisis sobre su actividad antivírica contra el virus de la gripe. Se infectaron células epiteliales de pulmón A549 con A/FPV/Bratislava/79 (H7N7) (MOI = 0,01) y se incubaron durante 8 horas, 24 horas y 36 horas en presencia o ausencia de ácido acetilsalicílico (5 mM) o LG-acetilsalicilato (5 mM). Después, se recogió el sobrenadante celular de cada muestra y se determinó la valoración de virus en el análisis de placa en células MDCK a partir de los mismos. La Figura 2 muestra una representación gráfica de las valoraciones de virus frente al tiempo. El resultado muestra que el LG-acetilsalicilato inhibe de manera igual de eficaz la multiplicación de virus en el aislado del H7N7 aviar altamente patógeno que el ácido acetilsalicílico.

Este es, tal como se muestra en la Figura 3, también el caso después de la infección con aislados altamente patógenos del subtipo H5N1. Se infectaron células epiteliales de pulmón A549 con el aislado del H5N1 humano A/Thailand/KAN-1/2004 (MOI = 0,001) y se incubaron en presencia o ausencia de ácido acetilsalicílico o ácido LG acetilsalicílico en las concentraciones indicadas. Se analizó el sobrenadante celular para determinar las valoraciones de virus en el análisis de placa sobre células MDCK. La Figura 3A muestra un valor de tiempo de 20 horas; en la

Figura 3B, las valoraciones de virus se representan en un diagrama cinético de crecimiento. En ambos casos, se puede observar una inhibición eficaz de las valoraciones de virus de la cepa H5N1 en varias potencias decimales.

Debido al alto potencial de eficacia antivírica *in vitro*, se puede suponer que la formulación LG-acetilsalicilato es adecuada como principio activo contra la gripe para una forma de administración de inhalación.

5 **Ejemplo 3:** Influjo del LG-acetilsalicilato sobre virus de gripe aviar altamente patógenos en el sistema de cultivo celular

Se cultivaron células MDCKII en medio MEM (MEM; Gibco (Invitrogen) Alemania 21430-079, lote 32034) con la adición de suero de carnero fetal desactivado térmicamente al 10 % (FCS, Laboratorios PAA/A04305-0346), penicilina (Grünenthal/616G03) y estreptomina (Sanavita/03056440111). Para la infección, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (8 x 10<sup>4</sup> células/pocillo; Greiner, Alemania, N° 662160, lote 05210151) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C. Antes de la infección, las células se lavaron con PBS, el virus correspondiente (FPV, SN1, MB1) se diluyó en PBS/BA (PBS suplementado con BA al 0,6 % (MP Biomedicals), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.9 mM, penicilina (Grünenthal/616G03) y estreptomina y se pipeteó con una MOI de 0,001 sobre la capa celular. Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a 37 °C, se retiró el virus inoculado, se añadió a las células 1 ml bien de medio MEM o bien de medio de MEM que contenía LG-acetilsalicilato 5 mM. Después de 8, 24, 32 y 48 horas después de la infección, se extrajo el sobrenadante respectivo. La presencia de partículas de virus infecciosas fue verificada en un “análisis de placa”.

Para el “análisis de placa”, se sembraron células MDCKII en placas de 96 pocillos, de tal manera que la capa celular fuera confluyente al día siguiente. Las células se lavaron con PBS y se infectaron con diluciones de los sobrenadantes, que se colocaron en PBS/BA, durante 60 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las células se recubrieron con una mezcla de medio y Avicel (Avicel RC-581 (FMC/B624C)). Para ello, una solución de Avicel al 2,5 % se mezcló con la misma cantidad de medio MEM 2x. Después de un tiempo de incubación de 20 horas, la mezcla de medio y Avicel se retiró, las células se fijaron con una solución de Roti@-Histofix al 4 % (Roth/32789170) en PBS durante 30 minutos a 4 °C y después se lavaron con PBS. Las siguientes etapas de trabajo que son necesarias para la tinción se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Mediante la incubación con Triton-X-100 al 0,3 % (Serva/30043) en PBS, se permeabilizaron las células. Las células infectadas con virus fueron teñidas mediante un procedimiento inmunohistológico. Para ello, las células se incubaron durante una hora con un anticuerpo monoclonal (Serotec/250107), que es específico de la nucleoproteína de virus de la gripe A. La detección de las células infectadas se realizó por medio de otra incubación (30 minutos) con un anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa (DIANOVA/75790) y la adición del sustrato de peroxidasa True Blue™ (KPL/070490). Las diluciones del anticuerpo se dispusieron en PBS con FCS al 10 % y Tween-20 al 0,1 % (Serva/16211). Después de la incubación con el anticuerpo primario y secundario, las células se lavaron tres veces durante 5 minutos con PBS/Tween-20 al 0,1 %. Para detener la reacción, las placas se lavaron con agua del grifo y se secaron. Las placas secas se escanearon y se valoraron usando el programa informático Corel Draw 9.0. Para determinar la valoración de virus de los sobrenadantes, se contaron las acumulaciones de células infectadas (focos) en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. El número de focos contados se multiplicó por el factor de dilución respectivo. A partir de los valores calculados, se determinó el valor promedio para cada muestra. La valoración de virus se indicó como logaritmo decimal de los valores promedio.

Los resultados se representan en la Figura 4. Se puede observar que la replicación tanto de un virus de H7N1 (FPV) como también de un virus H5N1 (MB1) se reduce mediante tratamiento con LG-acetilsalicilato en el sistema de cultivo celular parcialmente en más del 99 %.

**Ejemplo 4:** Análisis de los mecanismos de acción molecular que se basan en la actividad antivírica de LG-acetilsalicilato.

Además, se analizó si el perfil de acción molecular de LG-acetilsalicilato es comparable con el del ácido acetilsalicílico en forma de sustancia pura. El LG-acetilsalicilato debe actuar como inhibidor de NF-κB y correspondientemente no tener ningún efecto secundario sobre otras rutas de señal inducidas por virus. Un grupo importante de mediadores de señal, que se activan también después de la infección por virus de la gripe, son las llamadas proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). A las mismas pertenecen las quinasas JNK, p38 y ERK. Para el ácido acetilsalicílico en forma de sustancia pura ya se ha demostrado que la activación inducida por virus de estas quinasas no está inhibida por el ácido acetilsalicílico. Tal como muestra la Figura 5, este es también el caso para LG-acetilsalicilato: la activación inducida por virus de JNK, p38 y ERK (Figura 5, rastro 5), que puede detectarse por medio de anticuerpos específicos de fósforo contra la forma activa de estas quinasas en el análisis de inmunotransferencia (Western), no está bloqueada por la adición de ácido acetilsalicílico 5 mM (rastro 7) o de ácido acetilsalicílico 7 mM (rastro 9). El ácido acetilsalicílico actúa de manera antivíricamente mediante la inhibición de la expresión de factores proapoptóticos, lo que finalmente dará como resultado una activación de caspasa reducida en la célula. La Figura 6 muestra esto también para LG-acetilsalicilato mediante un análisis de inmunotransferencia (Western), que muestra la activación de caspasa mediante la escisión del sustrato de caspasa poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP). La banda de la PARP escindida (rastro 6) claramente visible después de 30 horas se reduce eficazmente en las muestras tratadas con LG-acetilsalicilato (rastro 7).

La etapa dependiente de NF- $\kappa$ B en la replicación de virus es la exportación dependiente de caspasa de complejos de ribonucleoproteína víricos (RNP) al citoplasma, que después pueden integrarse en la membrana celular de partículas nuevas de virus. El ácido acetilsalicílico bloquea específicamente esta etapa sin actuar sobre la acumulación de proteínas víricas en una etapa anterior del ciclo de multiplicación. Para LG-acetilsalicilato, sirve el mismo mecanismo de acción: la Figura 7 muestra en un análisis de inmunotransferencia (Western) que la acumulación de las proteínas víricas M1, NP, NS1 y PB1 no está inhibida por LG-acetilsalicilato. Sin embargo, se encuentra, tal como se ha descrito anteriormente para el ácido acetilsalicílico en forma de sustancia pura, una retención eficaz de complejos de RNP víricos, tal como se observa a partir de los análisis de inmunofluorescencia mostrados en la Figura 8.

De los mismos, se puede extraer la conclusión de que el ácido LG-acetilsalicílico tiene el mismo potencial antivírico que el ácido acetilsalicílico y actúa mediante mecanismos moleculares idénticos de manera inhibitoria sobre la multiplicación del virus.

**Ejemplo 5:** Reducción de la IP10 y nivel de expresión de ARNm de interferón-gamma después de tratamiento con LG-acetilsalicilato.

Se sabe que la producción excesiva de citoquinas, la llamada tormenta de citoquinas, es un factor de patogenicidad importante para infecciones por virus de la gripe H5N1. Puesto que la mayoría de estas citoquinas están reguladas de manera dependiente de NF- $\kappa$ B, debía verificarse si LG-ASA puede inhibir la expresión de citoquinas inducidas por virus y puede por lo tanto influir adicionalmente indirectamente en la patogenicidad de estos virus. Por trabajos previos propios se sabía que IP10 e IFN-gamma están regulados al alza después de una infección por H5N1 (MB1) en pulmones de ratón. La expresión de esta quimiocina o citoquina está inducida por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. En base a conocimientos previos, se pudo demostrar que la aspirina actúa como inhibidor de NF- $\kappa$ B.

El objetivo de este experimento era encontrar si el LG-acetilsalicilato actúa como inhibidor de NF- $\kappa$ B en pulmón de ratón después de infección por H5N1. Para ello, se analizó si el tratamiento de los ratones antes y durante la infección por MB1 con LG-acetilsalicilato tiene un efecto sobre la tasa de expresión de quimiocinas o de citocinas. Para el experimento, se trataron cinco ratones Balb/c respectivamente una hora antes de la infección (dosis de infección:  $1 \times 10^3$  ufp/50  $\mu$ l) i.v. (100  $\mu$ l) e i.p. (200  $\mu$ l) con LG-acetilsalicilato 50 mM. Los tratamientos posteriores se realizaron 17, 24 y 42 horas después de la infección. Después de 48 horas p.i., se extrajeron los pulmones y se aisló el ARN. La expresión de IP10 e IFN-gamma en los pulmones de ratón de ratones tratados con LG-acetilsalicilato en comparación con los animales de control se verificó por medio de PCR cuantitativa en tiempo real. Los datos se representan en la Figura 9.

La expresión de IP10 e IFN-gamma en ratones sin tratar se estableció como el 100 % para tener, de este modo, una posibilidad de comparación más clara. Después de un tratamiento de cuatro veces con LG-acetilsalicilato, tanto por vía intravenosa como también mediante la ruta de tratamiento intraperitoneal, pudo detectarse una reducción de la expresión de ARNm tanto en quimiocinas como en citocinas. La ruta de tratamiento intravenosa mostró, con una reducción del 62 % para IP10 y una reducción del 68 % para IFN-gamma, un efecto más fuerte que para la ruta de tratamiento intraperitoneal con el 26 % para IP10 y el 50 % para IFN-gamma.

Los resultados muestran que la expresión inducida por el virus de H5N1 de genes dependientes de NF- $\kappa$ B en pulmones de ratones infectados tratados con L-acetilsalicilato está fuertemente reducida. Esto es importante en el sentido en que la producción en exceso de citoquinas observada después de la infección por el virus H5N1 ("tormenta de citoquina"), que en su mayor parte están reguladas de manera dependiente de NF- $\kappa$ B, contribuye fuertemente a la patogenicidad de estos virus. Por lo tanto, LG-ASA influye no sólo directamente sobre la replicación del virus, sino que también influye indirectamente de manera positiva sobre el curso de la enfermedad mediante reducción de la producción excesiva de citoquina.

**Ejemplo 6:** Estudios de tolerancia.

En el siguiente experimento, se analizó la tolerancia de LG-acetilsalicilato después del tratamiento con aerosol en ratones. Para observar la influencia del tratamiento de la mejor manera posible, el experimento se llevó a cabo por medio del sistema de seguimiento de ratones. Esto permite la medición de la temperatura en tiempo real. Cada cinco minutos se determinó y se representó gráficamente un valor de temperatura (Figuras 10A-F). Además, los animales se pesaron cada día. Al final del tratamiento, los ratones se sacrificaron y se determinó el peso de órganos de hígado y bazo. Ya a los primeros signos de toxicidad de hígado, se produce un aumento del tamaño del hígado. Por contra, un aumento del tamaño del bazo es un signo de procesos de inflamación.

Para el estudio de tolerancia, se implantó un transmisor de seguimiento de ratón a un total de 12 ratones Balb/c hembra tres días antes del tratamiento. El éxito de la intervención se observó durante tres días. Después se trataron 6 ratones tres veces al día con 2 ml de solución de LG-acetilsalicilato 50 mM, respectivamente, usando un nebulizador Pari. Como controles se usaron 6 ratones, que se trataron con 2 ml de PBS. Las soluciones se nebulizaron con una presión de 150 kPa de tal modo que el tratamiento duró aproximadamente 10 minutos. El tratamiento se llevó a cabo diariamente durante 5 días a las 9:00, 12:00 y 15:00 horas.

Se analizó la influencia de LG-acetilsalicilato sobre el cambio de peso. Todos los ratones se pesaron diariamente comenzando el día del tratamiento y concretamente antes del primer tratamiento (9:00). El peso del primer día de tratamiento se estableció como el 100 % y el peso corporal determinado en los siguientes días se registró porcentualmente con respecto al mismo. La comparación de los dos grupos de tratamiento dio como resultado la gráfica representada en la Figura 11. A partir de la misma, se deduce que no hay ninguna diferencia significativa con respecto a los cambios del peso corporal entre el grupo de LG-acetilsalicilato y en el grupo tratado con PBS.

Además, se analizó la influencia de LG-acetilsalicilato sobre la temperatura corporal. Como ya se mencionó, el sistema de seguimiento de ratón posibilita la determinación de la temperatura corporal de ratones en tiempo real. Debido a que los ratones tienen un metabolismo alto, los cambios más pequeños de salud provocan ya cambios de la temperatura corporal. En la figura 10 se muestra el transcurso de la temperatura comenzando un día antes del tratamiento (Figura 10A) hasta el final del tratamiento (día +4 (Figura 10F)). No se puede observar ninguna diferencia con respecto a la temperatura corporal para los ratones tratados con LG-acetilsalicilato en comparación con los animales control.

Finalmente, se analizó la influencia de LG-acetilsalicilato sobre el peso de hígado y bazo. Quince minutos después del último tratamiento, todos los animales fueron sacrificados y se llevó a cabo una necropsia. Después de exsanguinación completa a través de la vena cava, se examinaron los órganos internos. Los pulmones se examinaron primero a través del diafragma en estado no desinflado. El hígado y bazo se pesaron. Los resultados se muestran en la Figura 13. Debido a que el peso corporal de los ratones no cambió esencialmente durante el tratamiento, pudo renunciarse a una normalización de los pesos de los órganos. Tanto para el bazo (Figura 12A) como también para el hígado (Figura 12B), no se pudo encontrar ninguna diferencia significativa en los pesos de los órganos de animales tratados con LG-acetilsalicilato y de los animales control. De este modo, después del tratamiento por inhalación de ratones, no se puede observar ningún signo de toxicidad hepática, que está acompañado frecuentemente por inflamación del órgano. Además, no se observó ninguna reacción de inflamación sistémica acompañada frecuentemente por un aumento de tamaño del bazo.

A partir de los estudios descritos anteriormente se deduce, como resumen, que la administración por inhalación de 2 ml de LG-acetilsalicilato con una concentración de 50 mM en un periodo de 5 días es bien tolerada por ratones.

#### **Ejemplo 7:** Ensayos en pacientes.

En un ensayo de curación, se administró a 4 pacientes con infecciones bronquiales una solución que contenía LG-ASA 2 M (50:50) y se pulverizó a tamaños de partículas inferiores a 5 µm. Las cantidades totales de LG-ASA fueron de hasta 350 mg. El flujo de inhalación se ajustó a menos de 500 ml/s, en la mayor parte de los casos a menos de 300 ml/s. El volumen de respiración fue al menos el 30 %, en la mayor parte de los casos al menos el 50 % de la capacidad de inspiración de los pacientes.

En tres de los pacientes se determinó una mejora significativa de los síntomas ya en el primer día después de la administración. Para todos los pacientes se observó una mejora de los síntomas el tercer día después de la administración. A este respecto, la tolerancia medida subjetivamente de estas altas concentraciones en las soluciones fue excelente. Ningún paciente informó de irritaciones del gusto. Además, no se determinó ningún aumento de los picores de garganta.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición que contiene una sal del ácido o-acetilsalicílico con un aminoácido seleccionado del grupo constituido por "lisina, arginina, ornitina, ácido diaminobutírico y mezclas de dichos aminoácidos", para su uso en la prevención o el tratamiento de infecciones víricas de seres humanos o de animales.
- 5 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, estando contenida adicionalmente una sal de ácido o-salicílico con glicina.
3. Composición para su uso según la reivindicación 2, en donde el aminoácido básico es D-lisina, L-lisina o una mezcla de D-lisina y L-lisina.
- 10 4. Composición para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, para la prevención o el tratamiento de infecciones por virus de gripe A o rinovirus.
5. Composición para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 4 en preparación galénica como composición acuosa líquida, en particular para la administración aerógena.
6. Composición para su uso según la reivindicación 5, en donde la composición acuosa es una solución acuosa de la sal 0,1 a 5 M, en particular 0,1 a 3 M, preferentemente 1 a 3 M.
- 15 7. Composición para su uso según la reivindicación 5, en donde la composición acuosa es una solución acuosa de la sal 0,01 a 100 mM, en particular 0,1 a 10 mM.
8. Composición para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición se dispone en un recipiente farmacéuticamente aceptable con un pulverizador o nebulizador.
- 20 9. Composición para su uso según la reivindicación 8, en donde el recipiente para el ajuste se dispone para un flujo de inhalación inferior a 1000 ml/s, preferentemente inferior a 500 ml/s, en particular inferior a 300 ml/s, así como de un volumen de respiración de al menos el 10 %, en particular al menos el 30 %, preferentemente al menos el 50 %, hasta el 95 %, con respecto a la capacidad de inspiración de un paciente.
10. Formulación de aerosol que contiene una composición según la reivindicación 1 a 5, un propelente y opcionalmente coadyuvantes y/o vehículos.
- 25 11. Formulación de aerosol según la reivindicación 10, en donde la sal se encuentra en una cantidad del 0,001 al 50 % en peso, del 0,001 al 10 % en peso, en particular del 0,1 al 10 % en peso o en particular del 10 al 50 % en peso, con respecto a la totalidad de la formulación.
12. Formulación de aerosol según la reivindicación 10 u 11, en donde la sal se encuentra en forma de partícula o solución con un valor de MMAD inferior a 10 µm, en particular inferior a 5 µm.

Fig 1A

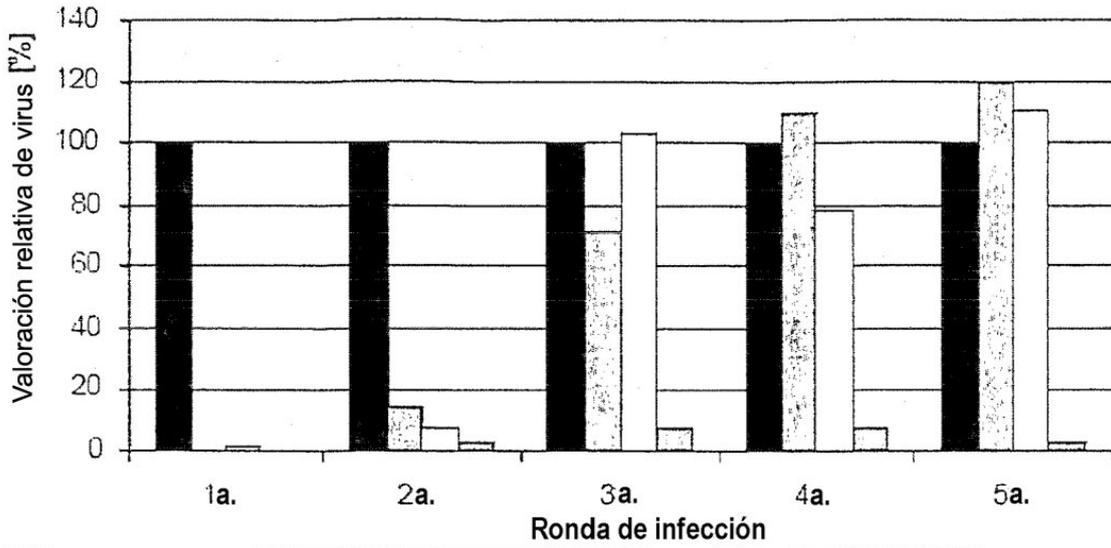


Fig 1B

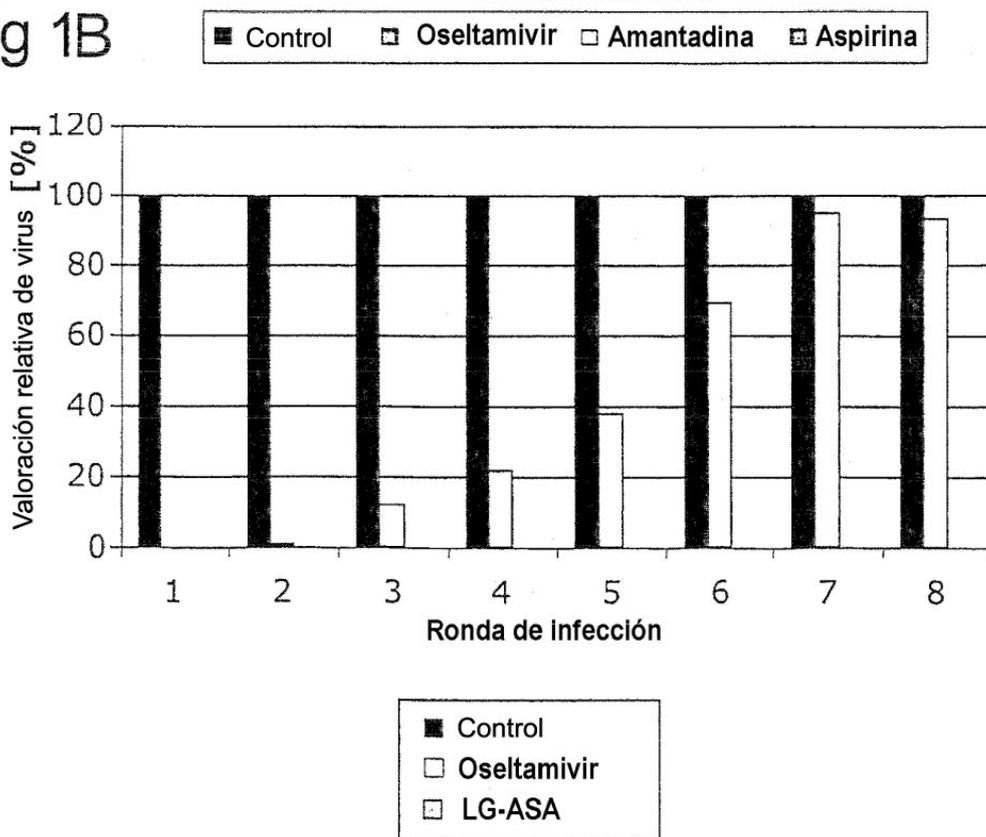


Fig 2

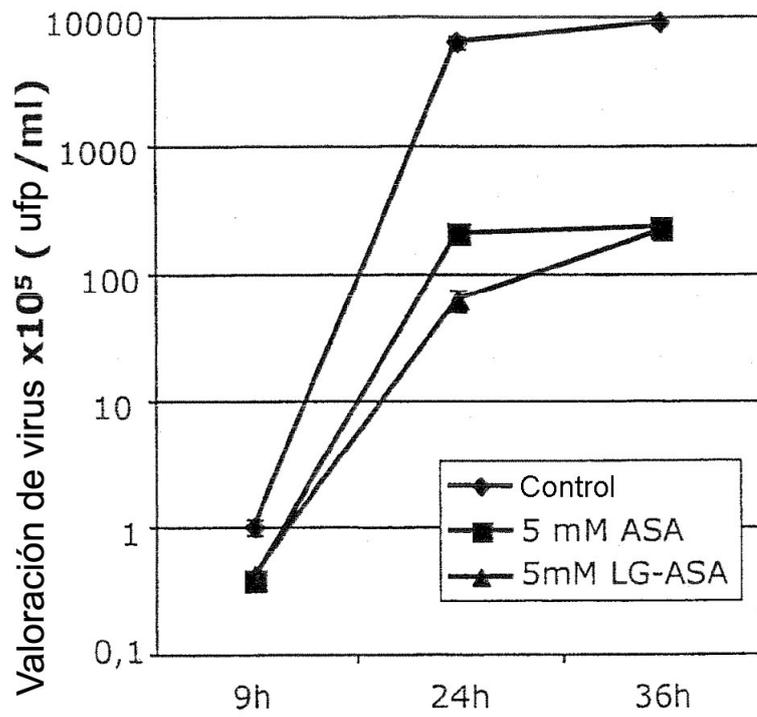


Fig 3A

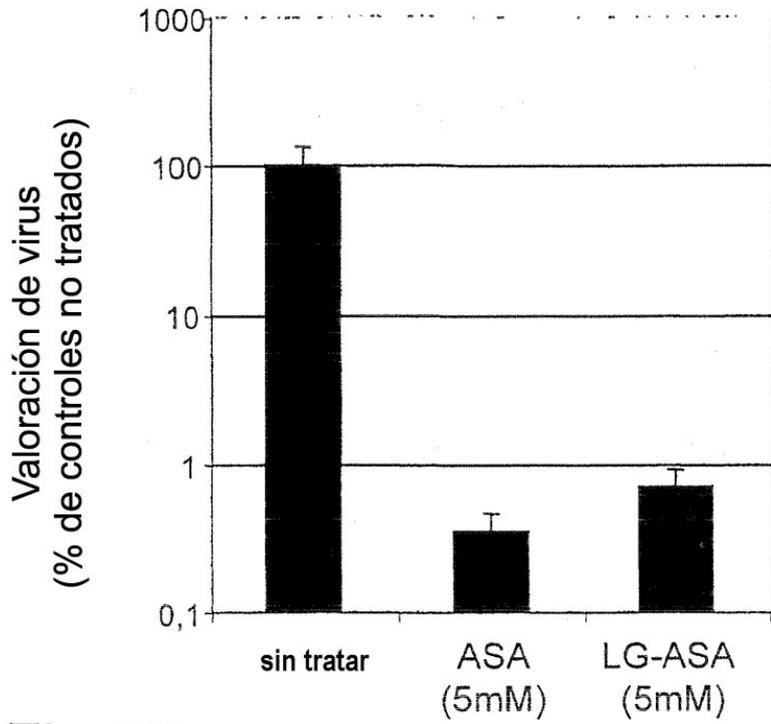


Fig 3B

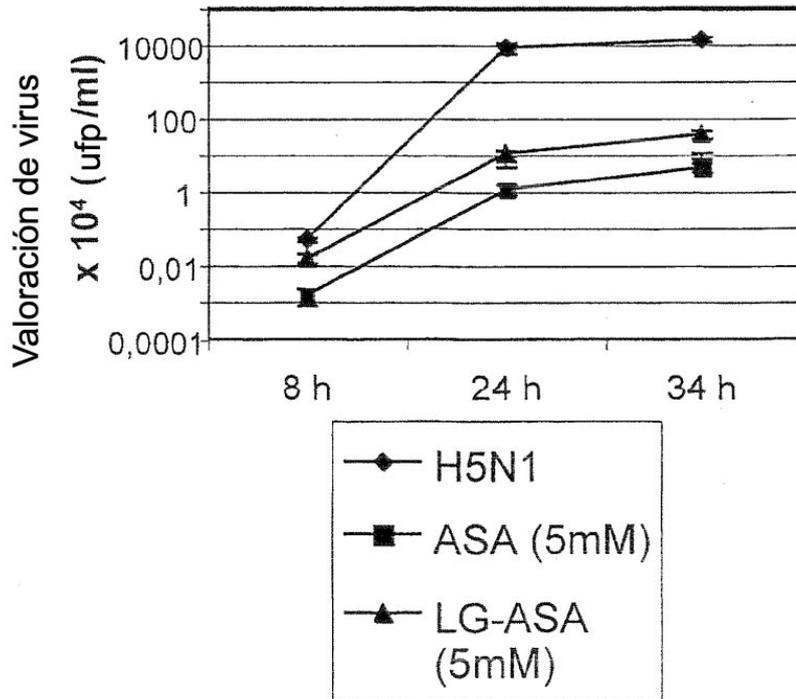


Fig 4A

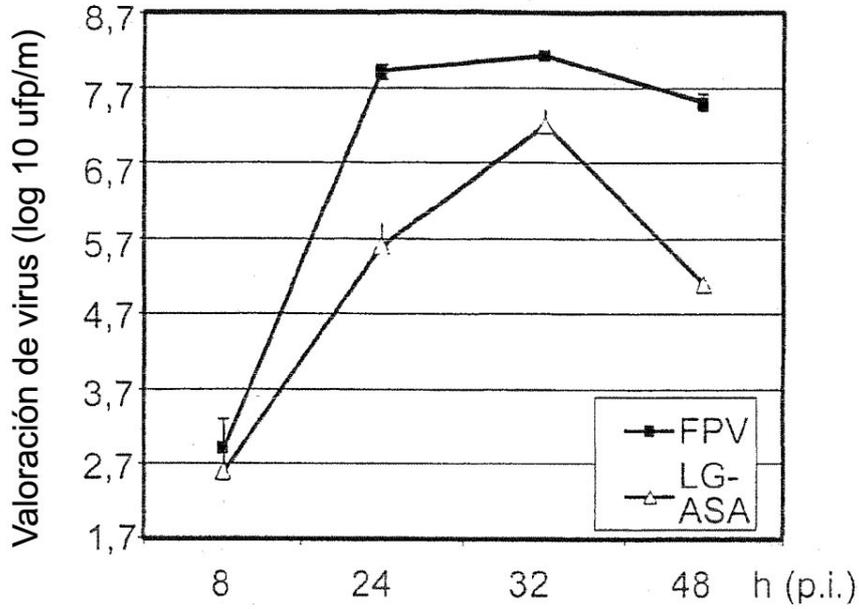


Fig 4B

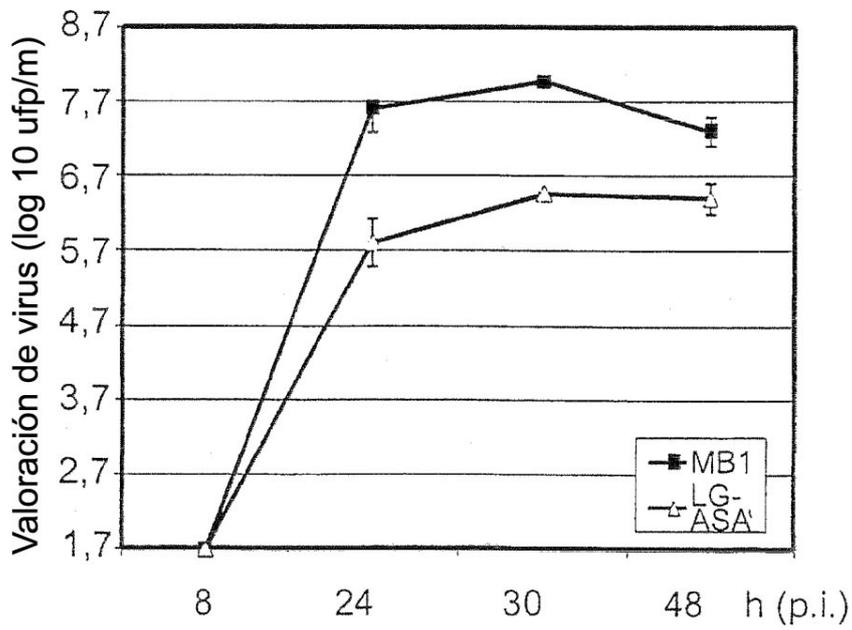


Fig 5

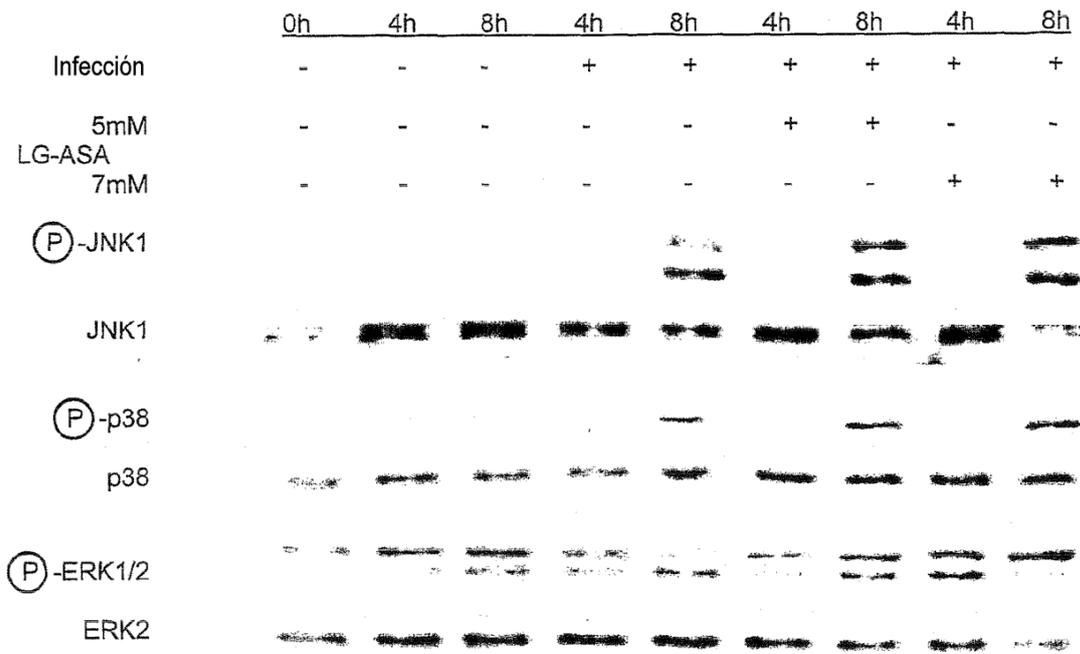


Fig 6

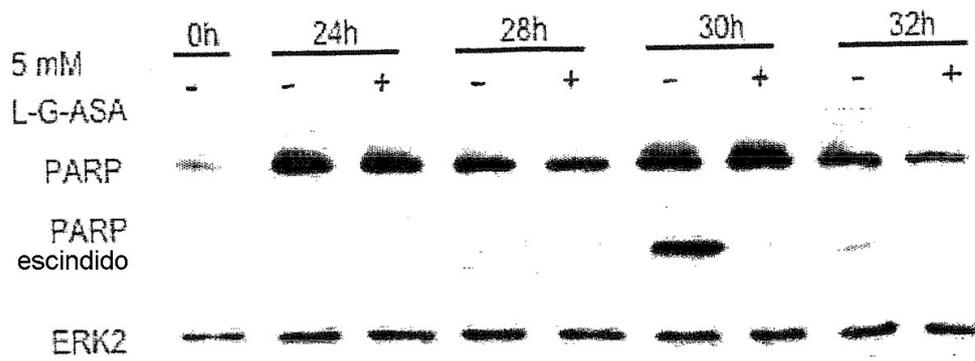


Fig 7

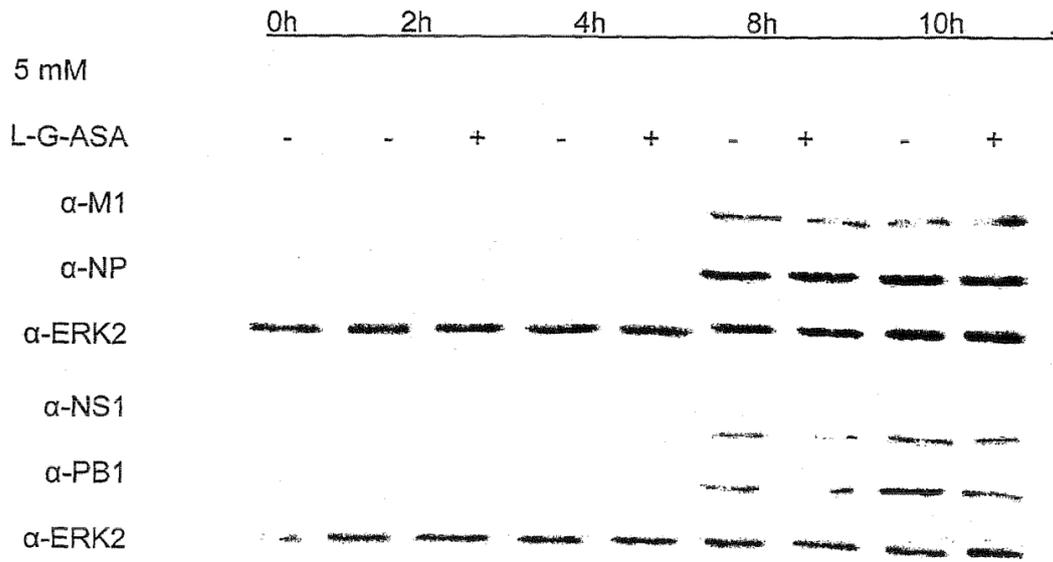


Fig 8

A/Thailand/KAN-1/2004 (H5N1)

(8h p.i.)

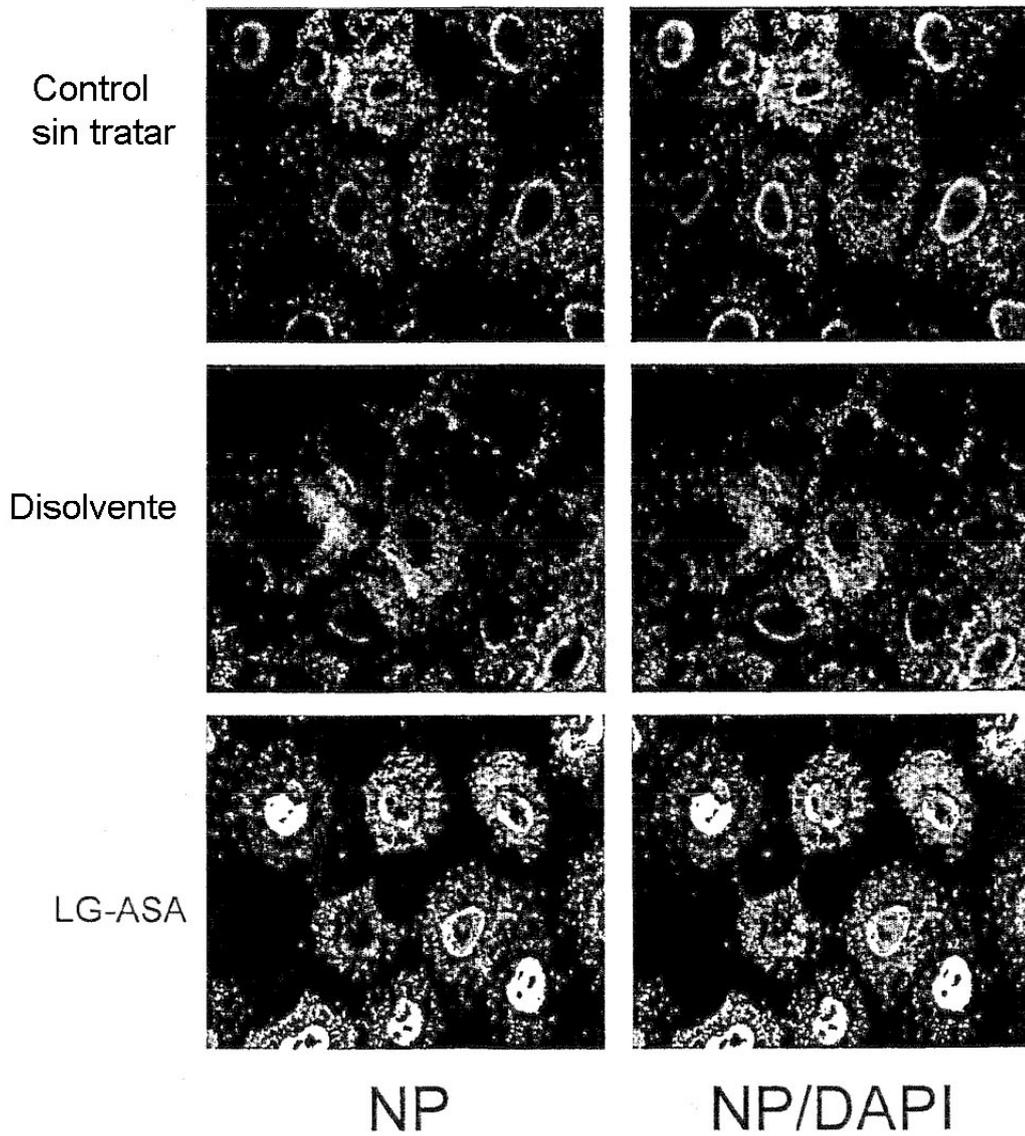


Fig 9

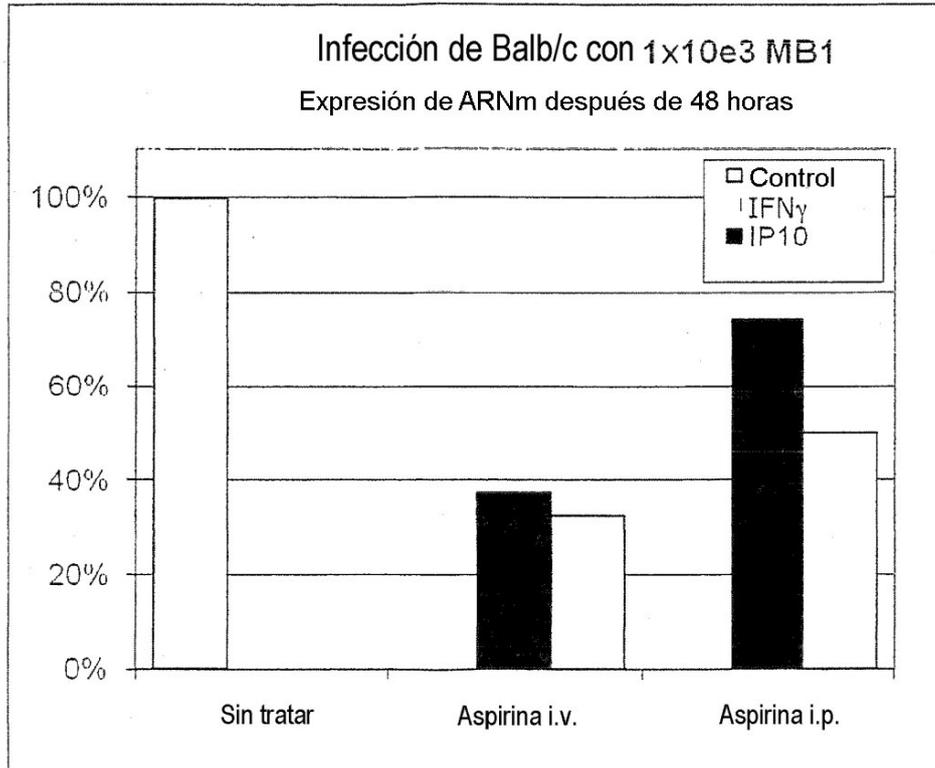


Fig 10A

Día -1

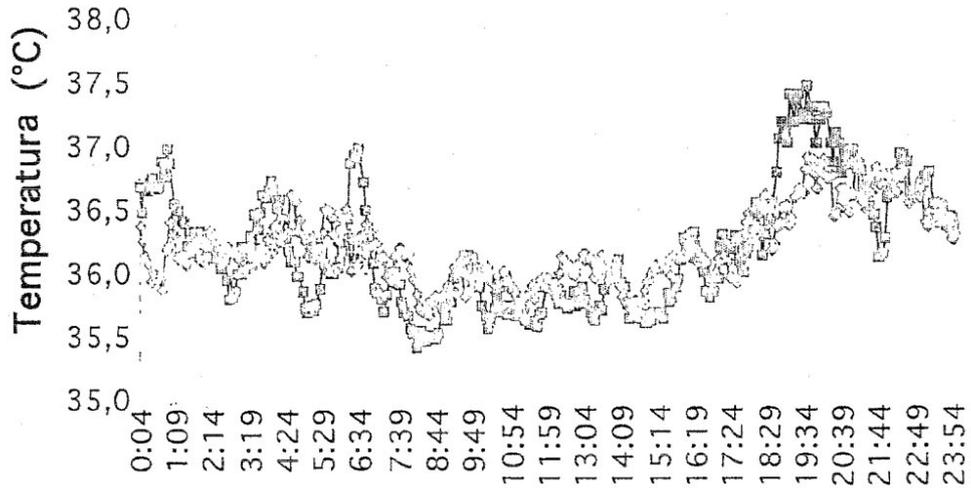


Fig 10B

Día 0

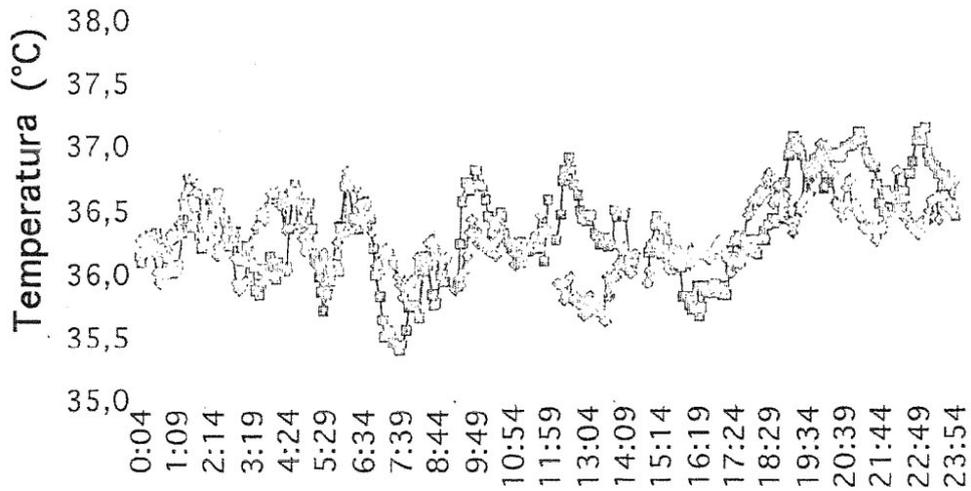


Fig 10C

Día +1

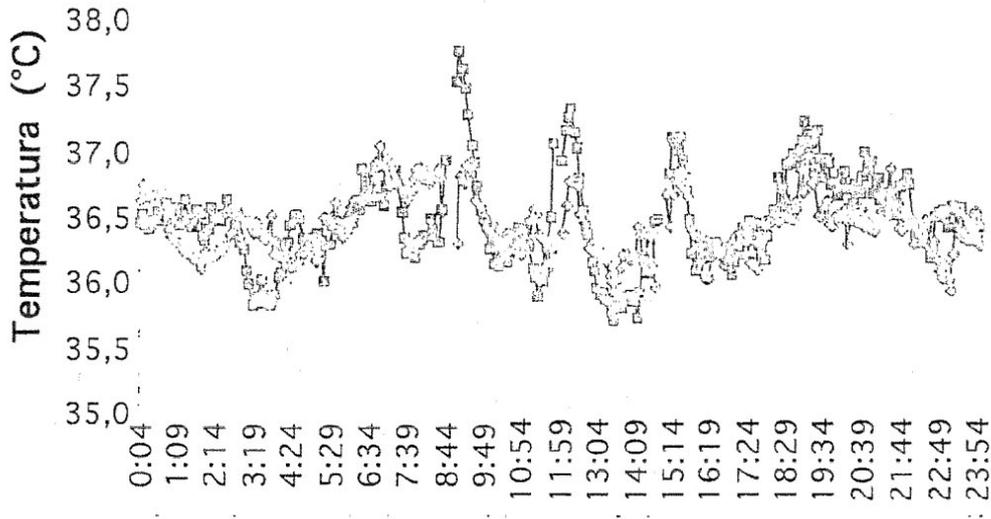


Fig 10D

Día +2

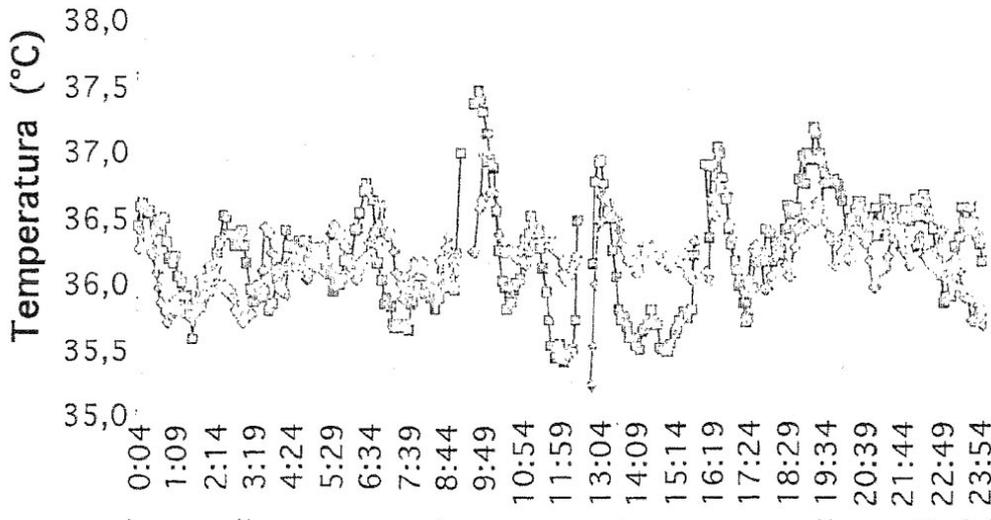


Fig 10E

Día +3

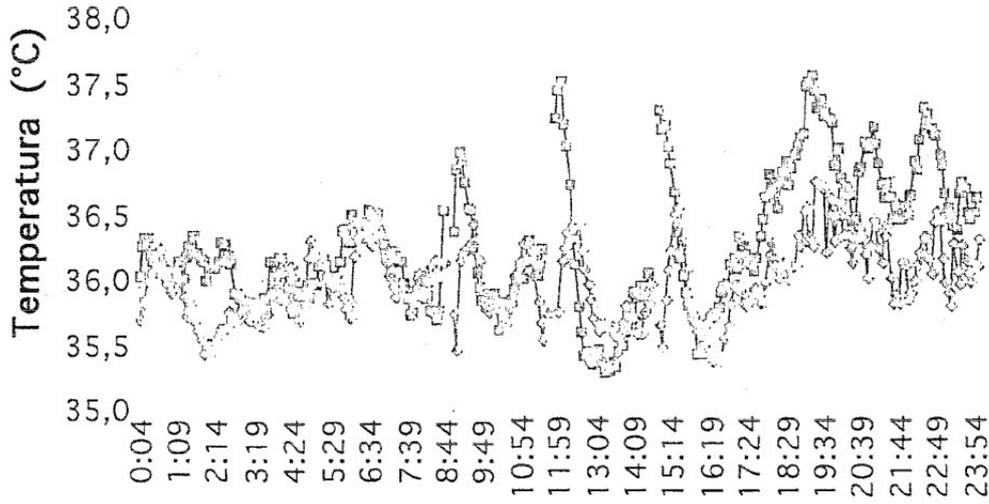


Fig 10F

Día +4

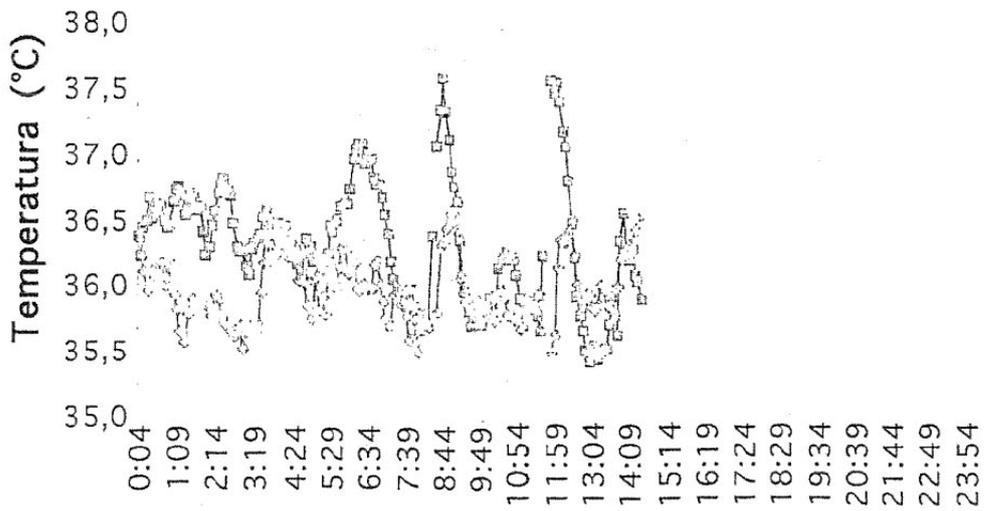


Fig 11

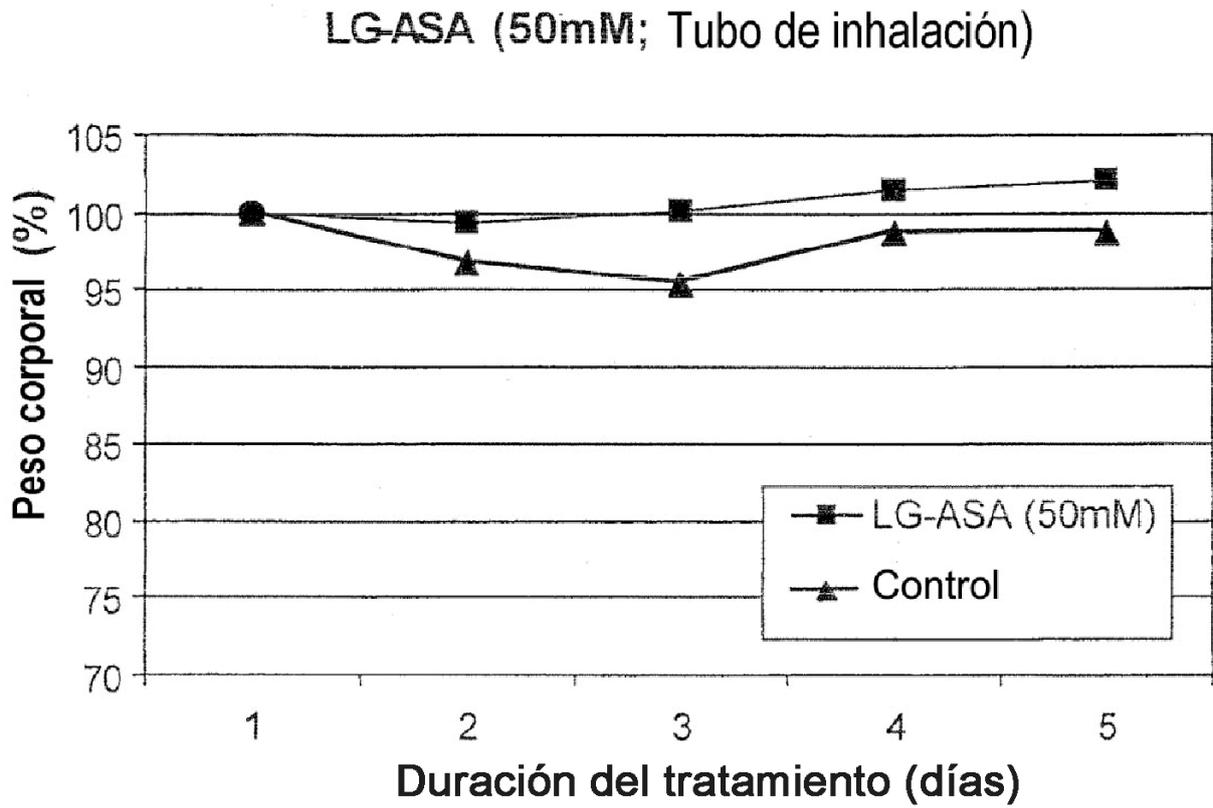


Fig 12A

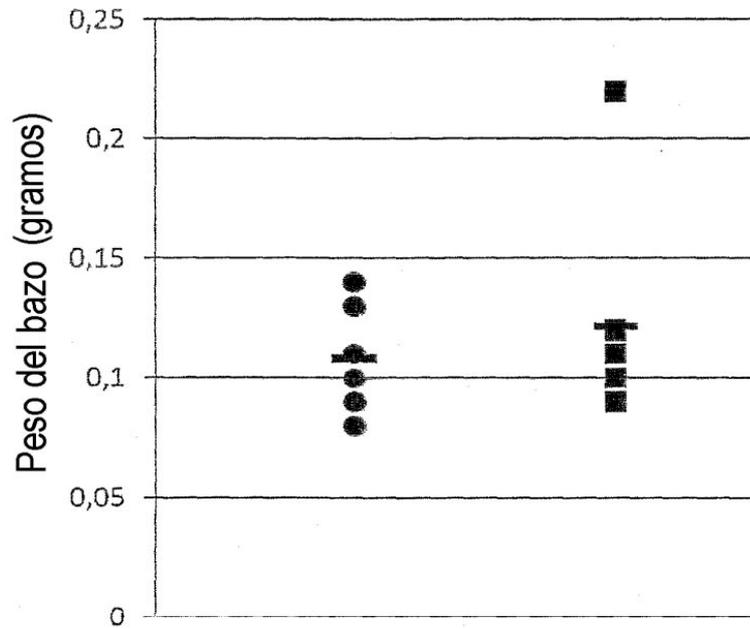


Fig 12B

