

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 976**

51 Int. Cl.:

A61K 31/145 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06838553 .3**

96 Fecha de presentación: **28.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1954258**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2008**

54

Título: **Materiales y métodos para tratar infecciones virales de gripe con un compuesto de cisteamina**

30

Prioridad:

28.11.2005 US 740584 P

02.06.2006 US 810773 P

06.07.2006 US 818885 P

25.09.2006 US 847020 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

17.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

17.12.2012

73 Titular/es:

**OBIO PHARMACEUTICAL (H.K.) LIMITED
(100.0%)**

**Suite 1211, 12/F., Tower 2, Silvercord 30 Canton
Road, Tsimshatsui
Kowloon, Hong Kong, HK**

72 Inventor/es:

**LIANG, HAO YI;
CHI, FRANCIS;
XU, QINGFU y
CHAN, BILL PIU**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 392 976 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

Materiales y métodos para tratar infecciones virales de gripe con un compuesto de cisteamina

Antecedentes de la invención

- 5 Un virus es un parásito pequeño que consiste en ácido nucleico (ARN o ADN) encerrado en una cápsula proteica. Los virus sólo pueden replicarse infectando a una célula hospedante susceptible y dirigiendo la maquinaria de la célula hospedante para producir más virus. Las glicoproteínas (ubicadas en la cápsula proteica) intervienen en la adsorción y en la penetración del virus en las células hospedantes susceptibles.
- 10 La mayoría de los virus se clasifican en categorías generales en base a los tipos de ácidos nucleicos formados durante la replicación y al mecanismo mediante el cual se produce el ARNm. En general, los virus tienen como material genético ARN o ADN, en donde el ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble.
- 15 Las familias importantes de virus de tipo ADN (también clasificadas como virus de Clase I y II – Véase Harvey, L. y col, *Molecular Cell Biology*, Cuarta Edición, W.H. Freeman and Company (2000)) incluyen adenoviridae, herpesviridae, poxviridae, papovaviridae, densoviridae y parvovirinae. Las familias de virus clasificadas habitualmente como tipo ARN (también clasificadas como Clases III-VI, Véase *Molecular Cell Biology*) incluyen birnaviridae, reoviridae, astoviridae, arterivirus, calciviridae, coronaviridae, flaviviridae, picornaviridae, togaviridae, poliovirus, bornaviridae, filoviridae, paramyxoviridae, pneumoviridae, rhabdoviridae, bunyaviridae y orthomyxoviridae.
- 20 La gripe es una enfermedad contagiosa provocada por el virus de la gripe, clasificado en la familia orthomyxoviridae. Existen tres tipos de virus de la gripe que afectan a los seres humanos: Gripe A, B y C. Se han aislado virus de la gripe A en muchas especies animales además de en humanos, mientras que se ha observado que los virus de la gripe B y C infectan fundamentalmente a humanos.
- 25 Los virus de la gripe son virus encapsulados que contienen ARNs de cadena sencilla negativos, que están segmentados y encapsulados. La cápsula del virus de la gripe se caracteriza por la presencia de dos glicoproteínas superficiales: hemaglutinina y neuraminidasa. Los viriones de gripe A y B son pleomórficos y normalmente presentan un diámetro de 80-120 nm. El virión de gripe C presenta muchas propiedades distintivas y por tanto se distingue de los viriones A y B, estrechamente relacionados.
- 30 Los virus de la gripe atacan al tracto respiratorio de los humanos (es decir, nariz, garganta y pulmones). Por ejemplo, la infección con gripe A o B a menudo puede provocar una enfermedad respiratoria aguda, altamente contagiosa. La infección de gripe habitualmente incluye los siguientes síntomas: fiebre, dolor de cabeza, cansancio (puede ser extremo), tos seca, dolor de garganta, congestión nasal y dolores corporales.
- 35 Se estima que millones de personas en los Estados Unidos –aproximadamente del 10% al 20% de los residentes de los EE.UU.– padecen gripe cada año. La mayoría de esta población generalmente se recupera en 1-2 semanas. Sin embargo, en algunos casos, pueden surgir complicaciones de una infección de gripe. Las personas que presentan un mayor riesgo de contraer complicaciones con una gripe incluyen: personas con más de 50 años de edad, niños con edades entre 6 y 23 meses, mujeres embarazadas de más de 3 meses, personas que viven en una instalación o institución de cuidados a largo plazo, personas con afecciones crónicas de corazón, pulmón o riñón, diabetes o sistema inmunitario debilitado. La neumonía, la bronquitis, la encefalitis, la otitis media, la rinitis y la sinusitis son sólo unos pocos ejemplos de complicaciones que pueden resultar de una infección de gripe. Además, la gripe puede empeorar problemas de salud crónicos. Por ejemplo, la gente con asma puede experimentar ataques de asma a la vez que padecen gripe, y la gente con fallo cardíaco congestivo pueden sufrir un empeoramiento de dicha afección producido por la gripe.
- 40 En los Estados Unidos mueren por gripe un promedio de aproximadamente 36.000 personas al año, y 114.000 al año son ingresadas en un hospital como resultado de la infección. Por lo tanto, los virus de la gripe tienen un impacto importante en mortalidad, lo que conduce a un incremento de la hospitalización y las visitas a los centros de cuidados sanitarios. Por ejemplo, a menudo se observan tasas elevadas de hospitalización en sujetos por encima de 45 65 años de edad y también en niños de menos de 5 años de edad.
- 50 Además, la propagación del virus de la gripe a través de una población puede originar una epidemia, que tiene un considerable impacto económico. Se observaron elevadas tasas de mortalidad debido a infección de gripe durante las epidemias de gripe de 1957, 1968 y 1977 (*Fields Virology*, Segunda edición, Volumen 1, páginas 1075-1152 (1990)). Periódicamente, el virus de la gripe provoca una epidemia mundial. Por ejemplo, la pandemia de gripe de 1918 provocó aproximadamente 20 millones de muertes en todo el mundo y aproximadamente 500.000 muertes en los Estados Unidos (*Medical Microbiology*, Cuarta Edición, University of Texas Medical Branch at Galveston (1996)).
- 55 Los virus de la gripe se transmiten predominantemente de persona a persona a través de gotas respiratorias (también conocido como propagación por gotas) que son liberadas con la tos y/o los estornudos. El virus de la gripe puede permanecer suspendido en el aire en gotas respiratorias hasta 3 horas; pero es sensible al calor y se desactiva rápidamente a temperaturas por encima de 50°C. El virus puede sobrevivir durante 24-48 horas en

superficies duras no porosas (es decir, receptores telefónicos, teclados de ordenador, pomos de puertas, encimeras de cocina, juguetes); 8 horas sobre ropa, papel y tejidos; y cinco minutos sobre las manos (véase Muir, P, "Treatment of Influenza. Essential CPE. Continuing Education from the Pharmaceutical Society of Australia", Editorial Paragon, Australasia, ACT (2002)). Los métodos típicos de transmisión incluyen el contacto de membranas mucosas con gotas respiratorias infectadas transportadas por el aire, el contacto persona a persona, el contacto con objetos contaminados (es decir, tejidos ensuciados con descargas nasales y de garganta infectadas).

La transmisión del virus de la gripe a través de gotas respiratorias puede producirse tan solo un día antes de que una persona experimente síntomas relacionados con la gripe. Los adultos pueden continuar transmitiendo el virus a otros durante otros tres a siete días después de la aparición inicial de los síntomas. Al contrario que los adultos, los niños tienen la capacidad de transmitir el virus durante un tiempo superior a los siete días. Los síntomas se presentan generalmente entre uno y cuatro días después de que el virus entre en el organismo. En determinados casos, se puede infectar una persona con el virus de la gripe sin demostrar ningún síntoma. Durante este tiempo, dichas personas todavía pueden transmitir el virus a otros.

Se dispone de pocos métodos para prevenir la infección de la gripe y todavía se debe desarrollar una cura. Los métodos para prevenir una infección de gripe incluyen la vacunación y las medicaciones antivirales. En los Estados Unidos se han aprobado tres fármacos antivirales (amantadine, rimantadine y oseltamivir) y se encuentran disponibles comercialmente para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad del virus de la gripe. Sin embargo, estos compuestos son fundamentalmente eficaces cuando se usan profilácticamente, lo que puede permitir que los virus de la gripe desarrollen resistencia frente a ellos rápidamente. Véanse las Patentes de EE.UU. Nº 3.352.912 y 3.152.180. Otros compuestos con actividad frente a los virus de la gripe han sido descritos en las Patentes de EE.UU. Nº 6.271.373; 5.935.957; 5.821.243; 5.684.024; 3.592.934; 3.538.160; 3.534.084; 3.496.228 y 3.483.254. El documento DE 19817511 describe el uso tópico de panthenol para el tratamiento de los virus de herpes simple y de la gripe.

Existe una enorme necesidad de nuevas terapias para el tratamiento de enfermedades víricas. Aunque se ha producido un gran progreso en el desarrollo de una variedad de terapias para el tratamiento de infecciones bacterianas, existen pocas terapias viables para el tratamiento de virus. Tal como se ha descrito anteriormente, los fármacos antivirales y las vacunas son los principales métodos usados en la prevención y/o el tratamiento de infecciones de gripe. Actualmente se emplean ganciclovir, acyclovir y foscarnet para el tratamiento de las infecciones de virus del herpes. Sin embargo, estas terapias pueden tener unos efectos secundarios sustanciales basados en sus efectos negativos sobre la replicación de ADN en la célula hospedante o su efecto sobre un número limitado de infecciones víricas. Adicionalmente, como se ha indicado antes, es conocido que los virus desarrollan resistencia a las terapias, lo que provoca una reducción progresiva de su eficacia.

Tal como se conoce hasta el momento, los compuestos de cisteamina no han sido presentados previamente como útiles para el tratamiento de infecciones víricas.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona materiales para tratar sujetos diagnosticados con infecciones del virus de la gripe, así como para prevenir el inicio de infecciones virales de gripe.

Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención proporciona una cisteamina, o una sal de la misma, para uso en el tratamiento de una infección vírica de gripe en un sujeto. Lodish, H. y col., *Molecular Cell Biology*, Cuarta edición, W. H. Freeman and Company (2000) describe una serie de virus de la gripe.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una cisteamina, o una sal de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en la reducción de la gravedad, intensidad o duración de complicaciones asociadas a una infección vírica de gripe.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona cisteamina, o una sal de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento de síntomas asociados a una infección vírica de gripe.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una cisteamina, o una sal de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en la prevención del desarrollo de una complicación relacionada con la infección vírica de gripe.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una composición para uso en la prevención de una infección vírica de gripe que comprende una cantidad efectiva de una cisteamina, o de una sal de la misma, y un fármaco antiviral.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad efectiva de una cisteamina, o de una sal de la misma, para uso en la prevención de una infección vírica de gripe y una materia farmacéutica para uso en el tratamiento de síntomas asociados a una infección de gripe.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona una cisteamina, o una sal de la misma, y un fármaco antiviral como una preparación para uso concurrente en el tratamiento de una infección vírica de gripe.

La presente invención es particularmente aplicable tanto a salud humana como animal, especialmente a animales infectados por virus de la gripe.

5 Un ejemplo específico de la presente memoria es el uso de un compuesto de cisteamina para tratar y/o prevenir una infección vírica de gripe. La administración de un compuesto de cisteamina a un sujeto antes de adquirir el virus de la gripe puede ayudar a proteger al sujeto frente a la infección de gripe, o al menos asegurar que los síntomas relacionados con la enfermedad del virus de la gripe se desarrollen en una menor extensión de lo que se observaría en ausencia del compuesto de cisteamina.

10 En otra realización, se puede usar un compuesto de cisteamina para prevenir y/o retrasar el desarrollo de complicaciones relacionadas con la gripe en sujetos que presentan un riesgo incrementado de contraer dichas complicaciones. Por ejemplo, complicaciones relacionadas con la gripe tales como encefalitis, bronquitis, traqueítis, miositis, rinitis, sinusitis, asma, infecciones bacterianas (es decir, infección bacteriana de *streptococcus aureus*, infección bacteriana de *haemophilus influenzae*, infección bacteriana de *staphylococcal pneumonia*), complicaciones cardíacas (es decir, fibrilación atrial, miocarditis, pericarditis), síndrome de Reye, complicaciones neurológicas (es decir, confusión, convulsiones, psicosis, neuritis, síndrome de Guillain-Barre, coma, mielitis transversa, encefalitis, encefalomielitis), síndrome de choque tóxico, miositis, mioglobinuria y fallo renal, difteria, otitis media, infecciones víricas (es decir, *pneumonia vírica*), fibrosis pulmonar, bronquiolitis obliterativa, bronquiectasia, exacerbaciones de asma, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, absceso pulmonar, empiema, aspergilosis pulmonar, miositis y mioglobinemia, fallo cardíaco, muerte fetal temprana y tardía en mujeres embarazadas, aumento de la mortalidad perinatal en mujeres embarazadas, anomalías congénitas en el nacimiento, se pueden reducir mediante el consumo de un compuesto de cisteamina.

25 En otra realización de la invención, se puede usar un compuesto de cisteamina para aliviar síntomas relacionados con la gripe en un sujeto diagnosticado con una infección de gripe. El compuesto de cisteamina puede usarse solo o concurrentemente con otros agentes conocidos que se usan para tratar/prevenir la enfermedad de virus de la gripe (es decir, vacunaciones, fármacos antivirales) o para tratar síntomas relacionados con la gripe (es decir, antitusivos, mucolíticos y/o expectorantes; antipiréticos y analgésicos; descongestivos nasales).

30 En una realización, un compuesto de cisteamina se usa solo o concurrentemente con otros agentes conocidos que se emplean para tratar/prevenir una infección vírica de gripe. Preferiblemente, un compuesto de cisteamina de la invención se usa antes, durante o después de una exposición de un sujeto a un virus de la gripe concurrentemente con agentes conocidos que se emplean para tratar/prevenir la enfermedad del virus de la gripe (es decir, vacunas, fármacos antivirales) o para tratar síntomas relacionados con la gripe (es decir, antitusivos, mucolíticos y/o expectorantes; antipiréticos y analgésicos; descongestivos nasales).

35 En una realización relacionada, un compuesto de cisteamina se usa solo o concurrentemente con otros agentes conocidos que se emplean para tratar y/o prevenir una infección vírica de gripe aviar (AIV, del inglés "Avian Influenza Virus"). De acuerdo con la presente invención, el compuesto de cisteamina puede ser para uso vía inyección o administración oral para tratar y/o prevenir una infección de ATV.

40 Preferiblemente, un compuesto de cisteamina es para uso solo o concurrentemente con otros agentes conocidos útiles en el tratamiento y/o la prevención de los diversos subtipos de virus de la gripe aviar. Más preferiblemente, un compuesto de cisteamina de la invención es para uso solo o concurrentemente con otros agentes conocidos útiles en el tratamiento y/o la prevención del AIV H5N1. Una dosis de al menos 0,1 mg/mL de hidrocloreto de cisteamina, más preferiblemente de al menos 1 mg/mL de hidrocloreto de cisteamina, e incluso más preferiblemente de al menos 2 mg/mL de hidrocloreto de cisteamina, se puede administrar a un sujeto para tratar y/o prevenir cualquiera de los subtipos de AIV enumerados anteriormente, preferiblemente una infección de AIV H5N1.

45 En determinadas realizaciones preferidas, la dosis de hidrocloreto de cisteamina administrada en el tratamiento y/o prevención de una infección de AIV H5N1 se correlaciona con la concentración de virus presente en el sujeto. Más preferiblemente, la dosis de hidrocloreto de cisteamina administrada en el tratamiento y/o prevención de infección de AIV H5N1 se correlaciona con una concentración inicial de aproximadamente la DL50.

50 De acuerdo con la presente invención, la cantidad de dosis diaria de un compuesto de cisteamina administrada a un sujeto antes de la infección vírica de gripe para proteger al sujeto frente a una infección vírica puede ser de aproximadamente 10 mg a 3.000 mg. Preferiblemente, un compuesto de cisteamina se administra a aproximadamente 200 mg y 900 mg de hidrocloreto de cisteamina a un sujeto para prevenir/tratar el inicio de una enfermedad de virus de la gripe (tal como virus de la gripe aviar, gripe A, gripe B y gripe C, o cualquier mutante de los mismos).

55 De acuerdo con la presente invención, la cantidad de dosis diaria de un compuesto de cisteamina administrada a un sujeto una vez que los síntomas asociados a una infección vírica de la gripe se han presentado es de

aproximadamente 10 mg a 3.000 mg. Preferiblemente, un compuesto de cisteamina se administra a aproximadamente 200 mg a 1.500 mg al día. En una realización más preferida, se administra entre aproximadamente 450 mg a 900 mg de hidrocloreuro de cisteamina diariamente a un sujeto para tratar y/o aliviar la gravedad de los síntomas asociados a una enfermedad vírica de gripe (tal como de virus de la gripe aviar, gripe A, gripe B y gripe C, o cualquier mutante de las mismas).

De acuerdo con la presente invención, la cantidad de dosis diaria de un compuesto de cisteamina administrada a un sujeto en riesgo de contraer complicaciones asociadas a una infección vírica de gripe es de aproximadamente 10 mg a 3.000 mg. Preferiblemente, un compuesto de cisteamina se administra a aproximadamente 200 mg a 1.500 mg al día. En una realización más preferida, se administran diariamente aproximadamente 450 mg a 900 mg de hidrocloreuro de cisteamina a un sujeto para prevenir y/o retrasar el inicio de complicaciones asociadas a la enfermedad del virus de la gripe (tal como virus de la gripe aviar, gripe A, gripe B y gripe C, o cualquier mutante de los mismos).

Breve descripción de las figuras

Figura 1: muestra la cisteamina como un constituyente de la co-enzima A.

Figura 2: muestra una ruta metabólica de la cisteamina.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona materiales para tratar infecciones víricas de gripe tratando/aliviando los síntomas asociados a las infecciones víricas de gripe; y/o previniendo/retrasando el inicio de complicaciones asociadas a infecciones víricas de la gripe.

El término "síntoma(s)" tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a los signos o indicaciones comunes de que un sujeto está padeciendo una afección o enfermedad específica. Por ejemplo, los síntomas asociados a una infección vírica de gripe, tal como se usa en la presente memoria, se refieren a los signos o indicaciones comunes de que un sujeto está infectado con un virus de la gripe. Los síntomas relacionados con la gripe contemplados en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, fiebre, dolor de cabeza, cansancio/fatiga, dolores musculares, dolor articular, ojos llorosos irritados, malestar, náuseas y/o vómitos, temblores, dolor de pecho, estornudos y síntomas respiratorios (es decir, membranas mucosas respiratorias inflamadas, quemazón subesternal, descarga nasal, garganta dolorida/irritada, tos seca, pérdida de olfato).

De acuerdo con la presente invención, los síntomas asociados a la infección vírica de gripe pueden iniciarse entre 24 y 48 horas después de la infección y pueden comenzar de repente. Los temblores o la sensación de temblor a menudo son la primera indicación de gripe. La fiebre es habitual durante los primeros días, y la temperatura puede subir a 38,9-39,4°C (102-103°F). En muchos casos, los sujetos se sienten lo suficientemente enfermos para permanecer en cama durante días; los sujetos a menudo experimentan dolores por todo el cuerpo, más pronunciados en la espalda y las piernas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "complicación(es)" se refiere a un proceso o evento patológico que se produce durante una enfermedad o afección que no es una parte esencial de la enfermedad o afección; que puede ser el resultado de la enfermedad/afección o de causas independientes. Por consiguiente, el término complicación(es) se refiere a problemas médicos/clínicos que se observan en sujetos diagnosticados con una infección vírica de gripe.

Una complicación de la infección vírica de gripe es que la infección vírica de gripe puede hacer empeorar problemas de salud crónicos. Por ejemplo, las complicaciones asociadas a una infección vírica incluyen, aunque sin limitación, encefalitis, bronquitis, traqueítis, miositis, rinitis, sinusitis, asma, infecciones bacterianas (es decir, infección bacteriana de *streptococcus aureus*, infección bacteriana de *haemophilus influenzae*, infección bacteriana de *staphylococcal pneumonia*), complicaciones cardíacas (es decir, fibrilación atrial, miocarditis, pericarditis), síndrome de Reye, complicaciones neurológicas (es decir, confusión, convulsiones, psicosis, neuritis, síndrome de Guillain-Barre, coma, mielitis transversa, encefalitis, encefalomielitis), síndrome de choque tóxico, miositis, mioglobinuria y fallo renal, difteria, otitis media, infecciones víricas (es decir, neumonía vírica), fibrosis pulmonar, bronquiolititis obliterativa, bronquiestasis, exacerbaciones de asma, exacerbaciones de enfermedad pulmonar obstructiva crónica, absceso pulmonar, empiema, aspergilosis pulmonar, miositis y mioglobinemia, fallo cardíaco, muerte fetal temprana y tardía en mujeres embarazadas, aumento de la mortalidad perinatal en mujeres embarazadas, anomalías congénitas en el nacimiento.

Los términos "gripe" o "virus de la gripe", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a un virus de ARN de la familia orthomyxoviridae, que incluye la gripe A, gripe B y gripe C, y mutantes de los mismos. Los virus de la gripe contemplados en la presente memoria incluyen aquellos virus que tienen dos enzimas glicosiladas antigénicas sobre su superficie: neuraminidasa y hemaglutinina. Los diversos subtipos de virus de la gripe que pueden tratarse usando los materiales y métodos de la invención incluyen, aunque sin limitación, los subtipos H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H3N8, N5N1, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2 y H10N7, que incluyen los siguientes

subtipos conocidos comúnmente como “Gripe española”, “Gripe asiática”, “Gripe de Hong Kong”, “Gripe aviar”, “Gripe porcina”, “Gripe equina” y “Gripe canina”.

5 El término “sujeto”, tal como se usa en la presente memoria, describe un organismo, que incluye humanos y mamíferos, para los cuales se proporciona un tratamiento con las composiciones de acuerdo con la presente invención. Las especies de mamífero que se benefician de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, simios, chimpancés, orangutanes, humanos, monos y animales domésticos (por ejemplo, mascotas), tales como perros, gatos, ratones, ratas, cobayas y hámsters.

10 “Administración concurrente” y “administrar concurrentemente”, tal como se emplean en la presente memoria, incluyen la administración de un compuesto o método terapéutico adecuado para uso con la composición de la invención (un compuesto de cisteamina) en el tratamiento de una infección vírica de gripe o para el tratamiento de síntomas/complicaciones de una infección vírica de gripe.

15 Para un sujeto diagnosticado con una infección de gripe, se puede administrar concurrentemente un compuesto de cisteamina con vacunas, fármacos antivirales, antitusivos, mucolíticos y/o expectorantes; antipiréticos y analgésicos; descongestivos nasales. A modo de ejemplo, se puede proporcionar un compuesto mezclado con un compuesto de cisteamina, tal como en una composición farmacéutica; o el compuesto y la cisteamina se pueden proporcionar como compuestos separados, tal como, por ejemplo, composiciones farmacéuticas separadas administradas consecutivamente, simultáneamente o a diferentes tiempos. Preferiblemente, si el compuesto de cisteamina y el agente conocido para tratar/prevenir la infección de gripe y/o tratar síntomas/complicaciones relacionados con la gripe se administran separadamente, no se administran tan separados en el tiempo uno del otro que el compuesto de cisteamina y el agente conocido no puedan interactuar.

20 En determinadas realizaciones de la invención, se puede administrar un compuesto de cisteamina concurrentemente con, aunque sin limitación, vacunas, medicaciones antivirales tales como amantadine, rimantadine, ribavirin, idoxuridine, trifluridine, vidarabine, acyclovir, ganciclovir, foscarnet, zidovudine, didanosine, zalcitabine, stavudine, famciclovir, oseltamivir y valaciclovir (materias y/o métodos usados para tratar una infección vírica); o antitusivos, mucolíticos y/o expectorantes; antipiréticos y analgésicos; descongestivos nasales (materias usadas para tratar síntomas asociados a una infección de gripe).

25 A modo de ejemplo, se puede proporcionar un compuesto para uso con un compuesto de cisteamina de la invención mezclado con el compuesto de cisteamina, tal como en una composición farmacéutica. Alternativamente, el compuesto y la cisteamina se pueden proporcionar como compuestos separados, tal como, por ejemplo, composiciones farmacéuticas separadas administradas consecutivamente, simultáneamente, o a diferentes tiempos. Preferiblemente, si el compuesto de cisteamina y el agente conocido para tratar/prevenir la infección de gripe y/o tratar síntomas/complicaciones relacionadas con la gripe se administran por separado, no se administran tan separados en el tiempo el uno del otro que el compuesto de cisteamina y el agente conocido no puedan interactuar.

30 Tal como se usa en la presente memoria, la referencia a un “compuesto de cisteamina” incluye cisteamina, las diversas sales de cisteamina, que incluyen sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto de cisteamina.

35 La expresión “sal farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sal de un compuesto de cisteamina que es farmacéuticamente aceptable y no reduce o inhibe mucho la actividad del compuesto de cisteamina. Los ejemplos adecuados incluyen sales de adición ácida, con un ácido orgánico o inorgánico tal como acetato, tartrato, trifluoroacetato, lactato, maleato, fumarato, citrato, metano, sulfonato, sulfato, fosfato, nitrato o cloruro.

40 Por consiguiente, en una realización de la presente invención, las ventajas de la cisteamina, tal como se establecen aquí, se pueden lograr promocionándola producción endógena de cisteamina a través de un proceso metabólico natural tal como a través de la acción de co-enzima A o como un precursor y/o metabolito de cisteína (véanse las Figuras 1 y 2). Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la administración de ácido pantoténico.

45 La expresión “cantidad efectiva”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad necesaria para provocar la respuesta biológica deseada, de acuerdo con la presente invención, la cantidad efectiva de un compuesto de cisteamina es la cantidad necesaria para tratar/prevenir una infección vírica de gripe; tratar/aliviar síntomas asociados a las infecciones víricas de gripe; y/o prevenir/retrasar/aliviar el inicio de complicaciones asociadas a infecciones víricas de gripe, en una realización preferida, la cantidad efectiva de un compuesto de cisteamina es la cantidad necesaria para tratar/prevenir una infección de gripe; tratar/aliviar síntomas asociados con una infección de gripe; y/o prevenir/retrasar/aliviar el inicio de complicaciones en pacientes con un riesgo incrementado de contraer complicaciones asociadas con una infección de gripe. El alivio de la gravedad del síntoma y/o complicación puede ser del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ó 99% de descenso de la gravedad.

50 La presente invención es particularmente aplicable a la salud de un sujeto no humano, especialmente sujetos no humanos infectados con un virus de gripe.

- 5 Con respecto a los sujetos humanos, la presente invención es particularmente aplicable al tratamiento y/o prevención de infecciones víricas de gripe, especialmente infecciones víricas de gripe aviar. De acuerdo con la presente invención, un compuesto de cisteamina es útil en el tratamiento y/o la prevención de varias cepas de gripe aviar, que incluyen los virus de subtipo H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2 y H10N7. En una realización de la invención, se usa hidrocloreuro de cisteamina para tratar y/o prevenir una infección de virus de gripe aviar H5N1 en humanos o animales. El hidrocloreuro de cisteamina se puede administrar solo o concurrentemente con otros agentes conocidos por ser eficaces en el tratamiento y/o la prevención de una infección de gripe.
- 10 En una realización relacionada, se administra un compuesto de cisteamina (tal como hidrocloreuro de cisteamina) solo o concurrentemente con otros agentes conocidos que se emplean para tratar y/o prevenir una infección vírica de gripe aviar (AIV). El compuesto de cisteamina se puede administrar a un sujeto mediante inyección o administración oral.
- 15 Preferiblemente, se puede administrar a un sujeto una dosis de al menos 0,1 mg/mL de hidrocloreuro de cisteamina, más preferiblemente de al menos 1 mg/mL de hidrocloreuro de cisteamina, e incluso más preferiblemente al menos 2 mg/mL de hidrocloreuro de cisteamina, para tratar y/o prevenir una infección de AIV H5N1.
- 20 En determinadas realizaciones preferidas, la dosis de hidrocloreuro de cisteamina administrada en el tratamiento y/o prevención de una infección AIV (que incluye los virus de subtipo H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2 y H10N7) se correlaciona con la concentración de virus presente en el sujeto. Más preferiblemente, la dosis de hidrocloreuro administrada en el tratamiento y/o prevención de una infección de AIV H5N1 se correlaciona con una concentración de aproximadamente la DL50 del virus presente en el sujeto.
- 25 Las composiciones de la invención se pueden usar en una variedad de rutas de administración, que incluyen, por ejemplo, formas administrables oralmente tales como comprimidos, cápsulas o similares, o vía parenteral, intravenosa, intramuscular, transdermal, bucal, subcutánea, supositorio, u otra ruta. Dichas composiciones se denominan aquí de forma genérica "composiciones farmacéuticas". Habitualmente, pueden encontrarse en forma de dosis unitaria, a saber, en unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para consumo humano, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables adicionales, es decir, un diluyente o vehículo.
- 30 Los compuestos de cisteamina de la presente invención pueden formularse de acuerdo a métodos conocidos de preparación de composiciones farmacéuticamente útiles. Las formulaciones se describen en una serie de fuentes, que son bien conocidas y fácilmente accesibles para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Science" (Martin EW [1995] Easton Pennsylvania, Mack Publishing Company, 19ª ed.) describe formulaciones que pueden usarse en relación con la presente invención. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen, por ejemplo, disoluciones de inyección estériles acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos, que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor objetivo; y suspensiones acuosas y no acuosas estériles, que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de multi-dosis, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en estado seco congelado (liofilizado) que requiere solo la aplicación del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, antes del uso. Las disoluciones y suspensiones de inyección extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos, comprimidos, etc., estériles. Debe entenderse que además de los ingredientes mencionados particularmente antes, las formulaciones de la presente invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica en función del tipo de formulación en cuestión.
- 35 40 45 50 Las formulaciones que comprenden un compuesto de cisteamina incluyen las adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), vaginal, parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradermal, intratecal y epidural) así como la administración al ojo. Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. Dichos métodos incluyen la etapa de reunir el compuesto de cisteamina con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan juntando uniforme e íntimamente el compuesto de cisteamina y los vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y a continuación, cuando sea necesario, conformar el producto. En determinadas realizaciones, el compuesto de cisteamina puede proporcionarse en una formulación para uso en un parche cutáneo.
- 55 La administración de un compuesto de cisteamina, de acuerdo con la presente invención, se puede llevar a cabo mediante cualquier método o técnica adecuados conocidos en el presente o prospectivamente por los especialistas en la técnica. En una realización preferida, se formula un compuesto de cisteamina en una formulación oral de fácil consumo y patentable, tal como una píldora, gragea, comprimido, chicle, brebaje, etc. El consumo se realiza entonces en el momento, antes o después de experimentar un episodio de estrés y/o cuando sea necesario para aumentar la actividad inmune (es decir, después de un diagnóstico de infección de gripe).

De acuerdo con la invención, las composiciones que comprenden como ingrediente activo una cantidad efectiva de la cisteamina para uso en el tratamiento de una infección vírica de gripe pueden comprender además uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Los ejemplos de dichos vehículos para uso en la invención incluyen etanol, dimetil sulfóxido, glicerol, sílice, alúmina, almidón, sorbitol, inositol, xilitol, D-xilosa, manitol, celulosa en polvo, celulosa microcristalina, talco, dióxido de silicio coloidal, carbonato cálcico, carbonato magnésico, fosfato cálcico, aluminosilicato cálcico, hidróxido de aluminio, fosfato de almidón sódico, lecitina y vehículos y diluyentes equivalentes.

Para proporcionar la administración de dichas dosis del tratamiento terapéutico deseado, las composiciones de la invención comprenderán típicamente entre aproximadamente 0,1% y 95% de la composición total, incluyendo el vehículo o diluyente. La dosis usada puede variarse en base a la edad, peso, estado de salud o género del individuo que va a ser tratado.

En una realización, la dosis de cisteamina administrada a un paciente para provocar una respuesta deseada es de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 3.000 mg diarios. La respuesta deseada puede incluir (1) la prevención de infecciones víricas de gripe; (2) una reducción de la gravedad, duración o intensidad de los síntomas asociados a infecciones víricas de gripe; y (3) la prevención, retraso o reducción de la gravedad, duración o intensidad de las complicaciones relacionadas con infecciones víricas de gripe. Preferiblemente, el hidrocloreto de cisteamina se administra diariamente a una dosis de aproximadamente 50 mg a 1.000 mg para producir una respuesta deseada. En una realización más preferida, la dosis de hidrocloreto de cisteamina administrada a un paciente para provocar una respuesta deseada es de aproximadamente 200 mg a 900 mg al día.

A continuación se muestran ejemplos que ilustran los procedimientos para llevar a la práctica la invención. Estos ejemplos no deberían tomarse por limitantes. Todos los porcentajes se presentan en peso y todas las proporciones de mezcla de disolvente están en volumen, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1 – Tratamiento de síntomas relacionados con la gripe

Un sujeto macho infectado con un virus de la gripe, que presentaba síntomas asociados a una infección de gripe (descarga nasal, fiebre, agotamiento), fue tratado inicialmente con un descongestivo nasal y con medicaciones mucolíticas. Las medicaciones fueron ineficaces para el tratamiento de los síntomas relacionados con la gripe en las primeras 24 horas.

Después de que las medicaciones demostraron ser ineficaces, se administró al sujeto oralmente una dosis de aproximadamente 700 mg de hidrocloreto de cisteamina. En menos de 24 horas los síntomas asociados a la infección de gripe habían desaparecido. El sujeto manifestó un sentimiento general de salud.

Ejemplo 2 – Estudio de la actividad antiviral de la cisteamina frente al virus de la gripe aviar H5N1: estudios *in vitro* e *in vivo* usando fosfato de oseltamivir como control

Según una realización de la invención, la cisteamina presenta actividad antiviral contra el virus de la gripe aviar H5N1. El objeto de la presente invención es particularmente ventajoso debido a los resultados inesperados con el virus de la gripe aviar. Por ejemplo, tal como se describe más adelante, la cisteamina es particularmente eficaz en el tratamiento del virus de la gripe aviar H5N1, más incluso que el fosfato de oseltamivir (cuyo nombre genérico es TAMIFLU®), que es un fármaco licenciado contra el virus de la gripe aviar.

Materiales y método

La cisteamina (denominada a partir de este punto "TG21"; que comprende un 99% de cisteamina) fue suministrada por Omega Bio-Pharma (H.K.) Limited. En este experimento se usaron huevos embrionados de gallinas libres de patógenos específicos (SPF, del inglés "specific-pathogen-free") (Beijing, China). La cepa CV de virus de la gripe aviar H5N1 fue aislada de pollos infectados. Se adquirieron pollos romanos a Hebei sin inmunización con vacuna de gripe aviar. El TAMIFLU® (Roche (China) Ltd., Shanghai, China) se usó como se describe en la presente memoria.

Evaluación de la toxicidad de TG21 en huevos de gallina embrionados

Se disolvió un gramo de TG21 en 10 mL (1:10) 0,01 mol/L, en PBS de pH 7,2 (1:10, 10 mg/mL), y a continuación se diluyó en serie a la mitad desde 1:10 hasta 1:5120. El fármaco diluido (grupo de ensayo) o el tampón de PBS (grupo de control) se inyectaron en las cavidades corio-alantoideas de huevos de gallina embrionados de 10 días de edad, 5 huevos para cada dilución. Los huevos fueron incubados a 37°C y monitorizados dos veces al día durante 5 días para observar la supervivencia embrionaria y calcular la DL50 (Dosis Letal al 50% del virus).

Evaluación de DIH50 de gripe aviar H5N1 en huevos de gallina embrionados

La reserva original de cepa CV de virus de la gripe aviar se diluyó 10 a 1 en serie con PBS de pH 7,2 a 0,01M desde 10^{-1} a 10^{-10} . Se inocularon 0,2 mL de virus diluido (grupo de ensayo) o de tampón PBS (grupo de control) en las cavidades corio-alantoideas de huevos de gallina embrionados de 10 días de edad, 5 huevos para cada dilución. Los huevos fueron incubados a 37°C y monitorizados dos veces al día durante 5 días para observar la supervivencia

embrionaria. Se calculó la DIH50 (Dosis Infectiva de Huevo al 50%) en base al método Reed-Muench.

Evaluación del efecto antiviral de TG21 sobre la gripe aviar en huevos de gallina embrionados

5 Se disolvió un gramo de TG21 en 10 mL de 0,01 mol/L, en PBS de pH 7,2 (1:10, 100 mg/mL), y a continuación se diluyó al 50% en serie entre 1:10 y 1:5120. La disolución de TG21 diluida se incubó con el mismo volumen de 10 ó 100 veces la DIH50 de cepa CV de virus de gripe aviar H5N1 a temperatura ambiente durante 30, 60 y 120 minutos, respectivamente, y a continuación se inoculó la disolución de mezcla virus-fármaco de 0,2 mL en las cavidades corio-alantoideas de huevos embrionados de 10 días de edad procedentes de gallinas SPF. Todos los huevos embrionados fueron incubados a 37°C y monitorizados dos veces al día durante 5 días para observar la supervivencia embrionaria. Se calculó la CI50.

10 Como control positivo, se evaluó el efecto antiviral de TAMIFLU® sobre el virus de la gripe aviar a 100 veces la DIH50.

Evaluación de la DL50 de virus de gripe aviar en pollos

15 La reserva original de cepa CV de virus de gripe aviar se diluyó 10 a 1 en serie con PBS de pH 7,2 0,01M desde 10^{-1} a 10^{-9} , y a continuación se usó para infectar los pollos mediante goteo nasal, 10 cabezas para cada dilución. Los animales fueron monitorizados dos veces al día durante 7 días para observar la supervivencia. Se calculó la DL50 de los virus de gripe aviar para pollos de acuerdo a la supervivencia de los animales.

Evaluación de la eficacia de TG21 contra gripe aviar en pollos

20 A pollos romanos de 4 a 6 semanas de edad se les administró TG21 a través del agua de bebida, con dosis de 40, 20, 10 mg de TG21/cabeza-día⁻¹ durante tres días, a continuación los pollos fueron expuestos a 2,5, 25 y 250 veces la DIH50 mediante goteo nasal, una vez al día durante tres días. Los animales continuaron aceptando el tratamiento con las mismas dosis de TG21 durante cinco días después de la exposición. Los pollos fueron monitorizados dos veces al día durante 7 días. En paralelo se llevó a cabo un control negativo sin tratamiento. Se registró la supervivencia de los animales y se evaluó la eficacia del fármaco TG21 de acuerdo con la siguiente fórmula: Eficacia = (tasa de mortalidad en el grupo de control – tasa de mortalidad en el grupo de tratamiento)/(tasa de mortalidad en el grupo de control) x 100%.

Resultados

1. Toxicidad.

30 120 horas después de inocular el TG21 en huevos embrionados, se detectó algo de toxicidad a dosis altas que oscilan entre aproximadamente 100 mg/mL (dilución 1:10) y 25 mg/mL (dilución 1:40). La DL50 de TG21 en huevos de gallina embrionados fue de 32,1 mg/mL. No se observaron efectos secundarios cuando la dosis era inferior a 12,5 mg/mL (1:80).

2. DIH50 de gripe aviar H5N1 en huevos de gallina embrionados, y DL50 en pollos.

35 Cuando se diluyó una reserva original de virus más de 10^9 veces (concentración 10^{-9}) los huevos embrionados sobrevivieron. De acuerdo con el método de Reed-Muench, se calculó una DIH50 de gripe aviar H5N1 en huevos de gallina embrionados de $10^{8,17}$. Cuando se diluyó la reserva de virus a 10^8 o menos, el virus evaluado no fue letal. La DL50 de gripe aviar H5N1 en pollos fue de $10^{5,41}/0,2$ mL.

3. Efecto antiviral de TG21 sobre virus de gripe aviar H5N1 en huevos de gallina embrionados.

40 Antes de la inoculación en huevos de gallina embrionados, los virus de gripe aviar H5N1 fueron tratados con diferentes diluciones de TG21 durante 30, 60 y 120 minutos. Las CI50s de TG21 frente a virus de gripe aviar H5N1 fueron 15,6, 14,9 y 6,8 mg/mL, respectivamente, con tiempos de tratamiento de 30, 60 y 120 minutos para una exposición a dosis vírica 10 veces la DIH50. Las CI50s fueron 17,5 y 16,1 mg/mL, respectivamente, cuando el virus fue tratado con TG21 durante 30 y 120 minutos antes de inoculación a dosis de virus de 10 veces la DIH50 (véase la Tabla 1, mostrada a continuación).

45 En un grupo de control positivo tratado con TAMIFLU®, las CI50s de TAMIFLU® frente a gripe aviar H5N1 en huevos de gallina embrionados fueron 25,1 y 19,4 mg/mL, respectivamente, con tiempos de tratamiento de 30 y 120 minutos antes de la inoculación con una dosis de virus 100 veces la DIH50. En un grupo de control negativo (sin administración de fármaco), todos los huevos de gallina embrionados murieron.

Tabla 1 – Efecto antiviral de TG21 sobre AIV H5N1 en huevos de gallina embrionados.

	10 DIH50 ^a			100 DIH50		
	30 min ^b	60 min	120 min	30 min	120 min	
Supervivencia de embriones (%)						
Diluciones de TG21	1:10 ^c	100% (16/16 ^d)	100% (17/17)	100% (21/21)	100% (16/16)	100% (16/16)
	1:20	100% (11/11)	100% (12/12)	100% (16/16)	100% (11/11)	100% (11/11)
	1:40	75% (6/8)	77,8% (7/9)	100% (11/11)	100% (6/6)	100% (6/6)
	1:80	37,5% (3/8)	40% (4/10)	66,7% (6/9)	0% (0/5)	20% (1/5)
	1:160	10% (1/10)	27% (3/11)	36,4% (4/11)	0% (0/10)	0% (0/9)
	1:320	0% (0/14)	0% (0/13)	21% (3/14)	0% (0/15)	0% (0/14)
	1:640	0% (0/19)	0% (0/18)	13% (2/16)	0% (0/20)	0% (0/19)
	1:1280	0% (0/24)	0% (0/23)	0% (0/19)	0% (0/25)	0% (0/24)
	1:2560	0% (0/29)	0% (0/28)	0% (0/24)	0% (0/30)	0% (0/29)
CI50 ^e						
CI50 (mg/mL)	15,6	14,9	6,8	17,5	16,1	

Nota: min = minutos; ^a DIH50: dosis de fármaco para un 50% de infección de huevos; ^b tiempo de reacción de fármaco-virus antes de inoculación; ^c la concentración inicial de fármaco es 100 mg/mL; ^d supervivencia/total; ^e CI50: concentración de fármaco requerida para una supervivencia del 50% de los embriones.

5

Eficacia del TG21 frente al virus de gripe aviar H5N1 en pollos.

10

Se administró 10-40 mg/cabeza-día⁻¹ de TG21 a pollos de cuatro a seis semanas de edad a través del suministro de agua durante tres días antes y durante cinco días después de la exposición a una dosis elevada de virus (250 x DL50), una dosis media de virus (25 x DL50) y una dosis baja de virus (2,5 x DL50) de virus de gripe aviar H5N1 infeccioso. Los resultados del efecto antiviral del TG21 sobre el virus de gripe aviar H5N1 en los pollos se muestran a continuación en la Tabla 2. Todos los pollos evaluados murieron a los tres días con dosis infecciosas de virus 250 veces la DL50, incluyendo los animales del grupo de control con TAMIFLU®. Esto puede deberse a que el nivel de dosis de infección vírica es tan elevado que ningún tratamiento médico, incluyendo el TAMIFLU®, puede proporcionar una protección eficaz frente a la infección vírica.

15

20

La protección de TG21 frente al virus de gripe aviar H5N1 en pollos en dosis de 40, 20, 10 mg/cabeza-día⁻¹ fue de 100%, 62,5% y 87,5%, respectivamente, a dosis víricas infecciosas de 2,5 veces la DL50, y 70%, 80% y 50%, respectivamente, a dosis víricas infecciosas 25 veces la DL50. La diferencia estadística de eficacia del TG21 y del control negativo (sin fármaco) fue extremadamente significativa (todo el volumen p < 0,01 mediante ensayo de Chi-cuadrado). La eficacia del TAMIFLU® (5 mg/cabeza-día⁻¹) fue del 50% a dosis de exposición vírica de 25 veces la DL50. No se observó una diferencia significativa entre la CI50 de TG21 (10 mg/cabeza-día⁻¹) y TAMIFLU® (5 mg/cabeza-día⁻¹) (P.>0,05) a dosis de exposición vírica de 25 veces la DL50 (Tabla 2).

Tabla 2 – Efecto antiviral de TG21 sobre virus de gripe aviar H5N1 en pollos

Fármaco y dosis	Dosis vírica infecciosa		
	250 DL50	25 DL50	2,5 DL50
40 mg/mL	0% (0/10 ^a)	70% (7/10) **	100% (10/10) **
TG21 20 mg/mL	0% (0/10)	80% (8/10) **	62,5% (7/10) **
10 mg/mL	0% (0/10)	50% (5/10) **	87,5% (9/10) **
Tamiflu (5,4 mg/mL)	0% (0/10)	50% (5/10) **	N/A
Control negativo	0% (0/10)	0% (0/10)	20% (2/10)

Nota: ** P<0,01 compara con el grupo de control mediante ensayo de Chi-cuadrado; a: supervivencia/total

5

Resumen

En este estudio se usaron huevos embrionados de diez días de edad de gallinas SPF (específicas libres de patógenos) y pollos de cuatro a seis semanas de edad para evaluar el efecto antiviral de TG21 sobre la cepa CV de virus de gripe aviar H5N1. En primer lugar se determinó la DL50 (Dosis Letal al 50%) del virus para los pollos, la DIH50 (dosis infectiva de huevo al 50%) del virus para los huevos embrionados y la DL50 del TG21 para los huevos embrionados. Para los estudios *in vitro* los virus fueron preincubados con diferente concentración de TG21 durante 30-120 minutos, respectivamente, y a continuación fueron inoculados en huevos embrionados para observar la supervivencia de los embriones. Se calculó la CI50 (concentración de fármaco requerida para que sobrevivan el 50% de los embriones) del TG21. Para los estudios *in vivo* se administró a los pollos TG21 en dosis altas, medias y bajas de AIV a través del suministro de agua durante tres días antes y cinco días después de la exposición a los virus. Se registró la supervivencia de los animales y se evaluó la eficacia del fármaco. Se llevaron a cabo un control positivo (TAMIFLU®) y un control negativo (sin fármaco) en estudios paralelos. Los resultados demostraron que, (1) las CI50s de TG21 frente a virus de gripe aviar H5N1 en huevos de gallina embrionados fue de 15,6, 14,9 y 6,8 mg/mL, respectivamente, cuando concentraciones de 10 veces la DIH50 de los virus fueron tratadas con TG21 30, 60 y 120 minutos antes de la inoculación, 17,5 y 16,1 mg/mL, respectivamente, cuando concentraciones de 100 veces la DIH50 de virus fueron tratadas con el fármaco durante 30 y 120 minutos antes de la inoculación. Las CI50s de TAMIFLU® frente a virus de gripe aviar H5N1 en huevos de gallina embrionados fueron de 25,1 y 19,4 mg/mL, respectivamente, cuando concentraciones de 100 veces la DIH50 de virus fueron incubadas con TAMIFLU® durante 30 y 60 minutos antes de la inoculación; y (2) la eficacia del TG21 en una dosis de 40, 20 y 10 mg/cabeza-día⁻¹ frente a virus de gripe aviar H5N1 indujo una mortalidad en pollos del 100%, 62,5% y 87,5%, respectivamente, con dosis de exposición vírica de 2,5 veces la DL50, y del 70%, 80% y 50% con dosis de exposición vírica de 25 veces la DL50, mientras que la eficacia del TAMIFLU® (5 mg/cabeza-día⁻¹) fue del 50%. Estos resultados sugieren que la cisteamina tiene una fuerte actividad antiviral contra el virus de gripe aviar H5N1, con lo que puede proporcionar una protección similar o superior frente al virus de gripe aviar H5N1 que los fármacos actualmente licenciados contra la gripe aviar, tal como el TAMIFLU®.

Ejemplo 3 – Actividad antiviral de cisteamina contra virus de gripe aviar H5N1 en ratones

Materiales y método

La cisteamina (denominada a partir de este punto "TG21"; que comprende un 99% de cisteamina) fue suministrada por Omega Bio-Pharma (H.K.) Limited. La cepa WV de virus de la gripe aviar H5N1 fue aislada de pollos infectados. El TAMIFLU® (Roche (China) Ltd., Shanghai, China) se usó como se describe en la presente memoria.

Evaluación de la dosis letal al 50% del virus de gripe aviar H5N1 en ratones (DL50r)

La disolución de reserva de gripe aviar H5N1 (cepa WV) se diluyó inicialmente 1:5 y a continuación se diluyó con PBS a una cuarta parte en serie durante 5 diluciones (de 1:5 a 1:1280). Se anestesiaron ratones hembra de seis a ocho semanas de edad mediante inyección intramuscular de 100 µL de barbiturato sódico al 1% y a continuación se inocularon goteando 50 µL de virus de gripe aviar H5N1 de cepa WV en la cavidad nasal de los ratones (n = 10 ratones para cada dilución). Se monitorizó a los animales diariamente durante 14 días y se calculó la DL50r en base

40

a la muerte de ratones con el método de Reed-Muench. Los resultados indican que la supervivencia de los ratones fue del 0% en el grupo de dilución de virus a 1:5, del 10% en el grupo de dilución de virus a 1:20, del 25% en el grupo de dilución de virus a 1:80, del 80% en el grupo de dilución de virus a 1:320 y del 90% en el grupo de dilución de virus a 1:1280. La DL50r de la gripe aviar H5N1 (cepa WV) fue de $10^{-2,1509}/0,05$ mL o de 1:141,5 de dilución/0,05 mL.

Papel terapéutico de la cisteamina en ratones infectados con el virus de la gripe aviar

Se repartieron cincuenta ratones hembra (de 6-8 semanas de edad) en tres grupos de tratamiento (T1, T2 y T3), un grupo de control negativo (sin tratar) y un grupo de control positivo (TAMIFLU®), con 10 ratones en cada grupo. Tras ser anestesiados vía inyección intramuscular de 100 µL de barbiturato sódico al 1%, todos los ratones fueron inoculados intranasalmente con 10 veces la DL50r de virus de gripe aviar H5N1 en 50 µL de PBS. Una hora después de la infección, los animales fueron tratados durante 12 días mediante administración oral con TG21 a una dosis diaria de 4,8, 2,4 y 1,2 mg por ratón en los grupos de tratamiento T1-T3, respectivamente, 0,3 mg diarios de TAMIFLU® por ratón en el grupo de control positivo y el mismo volumen de PBS en el grupo negativo.

Los ratones fueron observados dos veces al día durante 14 días para determinar signos clínicos de infección y para determinar la supervivencia. Se calculó la tasa de protección de TG21 frente a gripe aviar H5N1 y se compararon las diferencias significativas entre los grupos mediante el ensayo de Chi-cuadrado. Por ejemplo, la ecuación para identificar la tasa de protección (%) = (mortalidad en el grupo de control – mortalidad en el grupo de tratamiento)/(mortalidad en el grupo de control) X 100%. Los resultados demostraron que la protección fue del 50%, 70% y 10% en el grupo T1 de tratamiento con TG21 (4,8 mg/ratón·día⁻¹), en el grupo T2 de tratamiento con TG21 (2,4 mg/ratón·día⁻¹) y en el grupo T3 de tratamiento con TG21 (1,2 mg/ratón·día⁻¹), respectivamente, con una protección del 0% en el grupo de control negativo y una tasa de protección del 60% en el grupo de control positivo (TAMIFLU®). La tasa de protección de TG21 en el grupo T1 (P<0,05), en el grupo T2 (P<0,01) y en el grupo T3 (P<0,05) difirió significativamente de la del grupo de control negativo. Estos resultados indican que el TG21 tiene una fuerte actividad antiviral contra el virus de la gripe aviar H5N1, como un fármaco ideal en el tratamiento de infecciones víricas de gripe aviar.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una cisteamina, o una sal de la misma, para uso en el tratamiento de una infección vírica de gripe en un sujeto.
- 5 2.- La cisteamina, o una sal de la misma, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la infección vírica se selecciona del grupo que consiste en virus de gripe aviar y virus de gripe A, B y C.
- 3.- La cisteamina, o sal de la misma, de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el sujeto es infectado con al menos un subtipo de gripe aviar seleccionado del grupo que consiste en H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2 y H10N7.
- 10 4.- La cisteamina, o sal de la misma, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la administración de al menos 0,1 mg de la cisteamina, o sal de la misma, al sujeto diariamente.
- 5.- La cisteamina, o sal de la misma, de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende la administración de entre 2 mg y 3.000 mg de la cisteamina, o sal de la misma, diariamente.
- 6.- La cisteamina, o sal de la misma, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha sal de cisteamina es hidrocloreuro de cisteamina o fosfato de cisteamina.
- 15 7.- La cisteamina, o sal de la misma, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha cisteamina o sal de la misma se administra oralmente, parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, transdermalmente, vía ruta bucal, subcutáneamente o vía supositorio.
- 8.- Una cisteamina, o sal de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en la reducción de la gravedad, intensidad o duración de complicaciones asociadas con una infección vírica de gripe.
- 20 9.- Una cisteamina, o sal de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento de síntomas asociados a una infección vírica de gripe.
- 10.-Una cisteamina, o sal de la misma, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en la prevención del desarrollo de una complicación relacionada con una infección vírica de gripe.
- 25 11.-Una composición para uso en la prevención de una infección vírica de gripe que comprende una cantidad efectiva de una cisteamina, o sal de la misma, y un fármaco antiviral.
- 12.-La composición, de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la infección vírica de gripe es un virus de gripe aviar y en donde el fármaco antiviral se selecciona del grupo que consiste en ganciclovir, acyclovir, foscarnet, amantadine, rimantadine y oseltamivir.
- 30 13.-Una composición que comprende una cantidad efectiva de una cisteamina, o sal de la misma, para uso en la prevención de una infección vírica de gripe y un material farmacéutico para uso en el tratamiento de síntomas asociados a una infección de gripe.
- 14.-La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la infección vírica de gripe es un virus de gripe aviar y en donde el material farmacéutico se selecciona entre antitusivos, mucolíticos, expectorantes, antipiréticos, analgésicos y descongestivos nasales.
- 35 15.-Una cisteamina, o sal de la misma, y un fármaco antiviral como preparación para el uso concurrente en el tratamiento de una infección vírica de gripe.
- 16.-La cisteamina, o sal de la misma, y el fármaco antiviral de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la infección vírica de gripe se selecciona entre los virus definidos en cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3.
- 40 17.-La cisteamina, o sal de la misma, y el fármaco antiviral de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16, que además comprende cualquiera de las características de las reivindicaciones 4 a 7.

Cisteamina - Constituyente de Co-enzima A

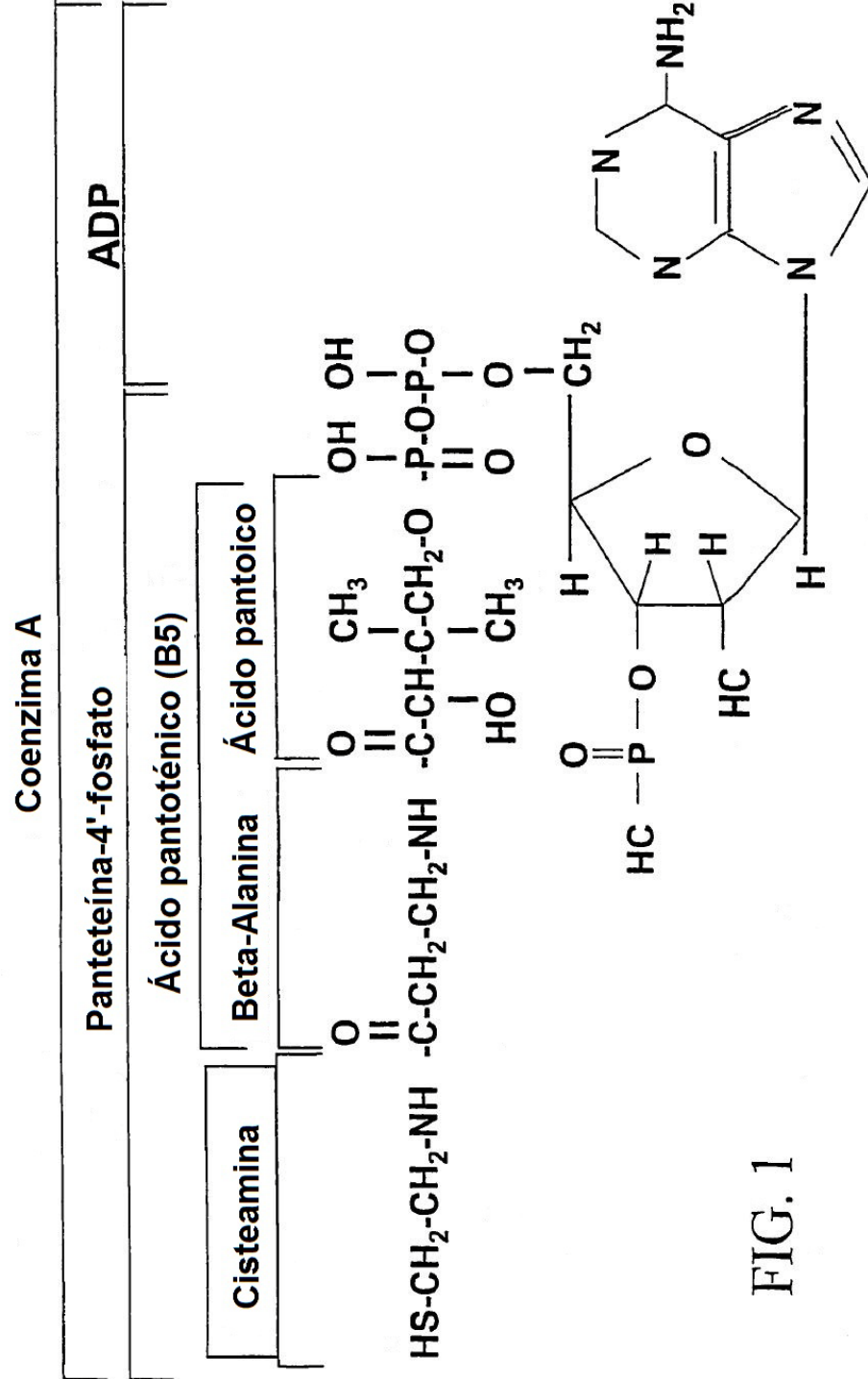


FIG. 1

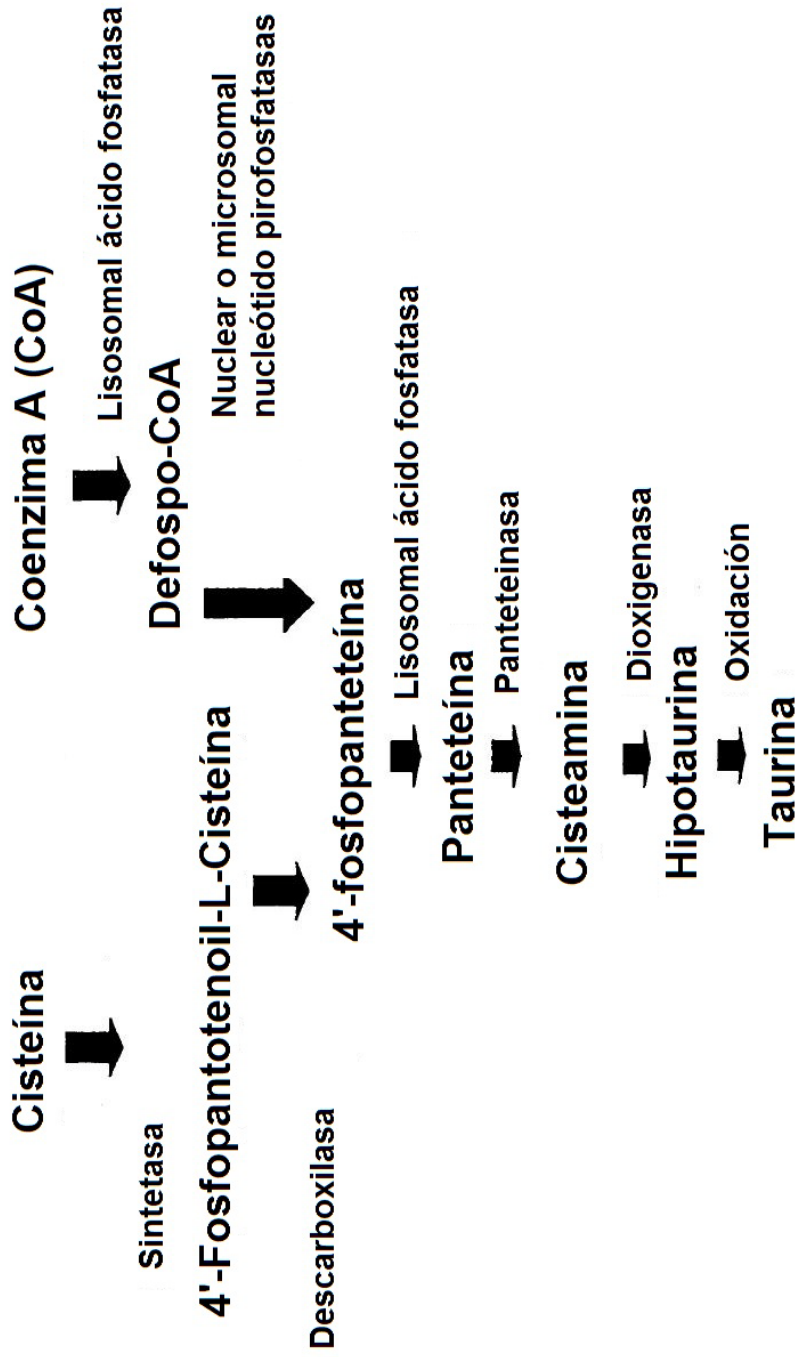


FIG. 2