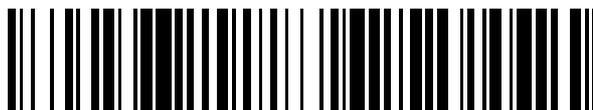


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 684**

51 Int. Cl.:

A61K 31/737 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2008 E 08785672 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2178533**

54 Título: **Composición antiviral que comprende un polisacárido sulfatado: iota carragenano**

30 Prioridad:

24.08.2007 US 935668 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.06.2013

73 Titular/es:

**MARINOMED BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)
VETERINÄRPLATZ 1 GEBÄUDE HA/3/STG. 3
1210 VIENNA, AT**

72 Inventor/es:

**GRASSAUER, ANDREAS y
PRIESCHL-GRASSAUER, EVA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 406 684 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición antiviral que comprende un polisacárido sulfatado: iota carragenano

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al iota carragenano y a sus composiciones farmacéuticas, en donde dicho iota carragenano está presente como un ingrediente activo antiviral, para el uso médico o veterinario en la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por o asociadas con un virus que entra en el cuerpo de un individuo vía el tracto respiratorio, el virus se selecciona del grupo del virus de la influenza humana A, los Paramyxoviridae y los Adenoviridae.

Antecedentes de la invención

10 Los Orthomyxoviridae son virus ARN, cuyos miembros más prominentes son las especies del virus de la influenza. Los virus de la influenza A y B son los dos tipos de virus de la influenza que causan enfermedades humanas epidémicas. Típicamente se extienden de persona a persona, sobre todo a través de la transmisión de gotitas respiratorias.

15 La familia de los Paramyxoviridae incluye el virus sincitial respiratorio (VSR), el virus de la parainfluenza y el metapneumavirus. Las infecciones por virus VSR y de parainfluenza pueden causar infecciones respiratorias serias en infantes y niños pequeños pero pueden también causar enfermedades serias en las personas mayores y adultos que tengan un sistema inmune deteriorado.

20 Entre las especies de virus de la parainfluenza del ser humano se conocen cuatro miembros que causan enfermedades respiratorias serias en los niños para quienes no hay prevención o terapia eficaz actualmente disponible, los cuatro miembros son los virus de la parainfluenza tipos 1 a 4. Se cree que los brotes de virus de la parainfluenza y VSR contribuyen sustancialmente a tasas crecientes de hospitalización y mortalidad. Los pacientes con un sistema inmune, cardíaco o pulmonar deteriorado están en riesgo creciente de sufrir complicaciones serias después de una infección de paramixovirus y por lo tanto se beneficiarán particularmente de una terapia antiviral.

25 El virus sincitial respiratorio (VSR), que es el patógeno respiratorio más extenso aflige típicamente a individuos durante la infancia y niñez temprana por todo el mundo, causando brotes anuales de pulmonía y de bronquiolitis durante el invierno y la primavera temprana. La pulmonía y bronquiolitis por VSR requiere la hospitalización de cientos de miles de infantes cada año. La protección pasiva contra VSR está disponible por lo menos en parte en una tasa divulgada como del 55% con una inyección intramuscular mensual del anticuerpo monoclonal anti-VSR humanizado palivizumab (Synagis®).

30 La familia de los Coronaviridae incluye los torovirus y coronavirus. Se sabe que los coronavirus infectan el tracto respiratorio superior y el tracto gastrointestinal en mamíferos y pájaros. Se cree que los coronavirus causan un alto porcentaje de todos los resfriados comunes en los adultos humanos.

35 Los Adenoviridae son virus ADN que infectan típicamente el tracto respiratorio superior. Actualmente se conocen más de 50 serotipos diferentes de adenovirus humano, agrupados en seis subtipos A a F, que son responsables del 5 - 10% de las infecciones del tracto respiratorio superior en niños.

Debido a lo ya mencionado se cree que existe una gran necesidad de una composición farmacéutica antiviral potente que sea fácilmente aplicable y eficaz en la prevención o el tratamiento de las infecciones virales respiratorias causadas por los miembros de las familias de los Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae, Coronaviridae y/o Adenoviridae.

40 Se ha sabido durante décadas que los polisacáridos sulfatados incluyendo los carragenanos y fucoidanos tienen eficacia antiviral. Por consiguiente, la técnica anterior está repleta de artículos científicos sobre los efectos antivirales de los carragenanos. En una revisión de lo más interesante, Gonzalez M.E. et al. (1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31, 1388-1393) informan sobre la eficacia antiviral de diversos polisacáridos sulfatados incluyendo el iota carragenano contra varios virus animales. El iota carragenano demostró actividad antiviral contra los virus con envoltura HSV-1, HSV-2, virus del bosque de Semliki (SFV), virus del vaccinia y virus de la peste porcina africana (ASF) y contra el virus desnudo de la encefalomiocarditis (EMC). El iota carragenano no tuvo ningún efecto sobre el virus con envoltura de la estomatitis vesicular de los virus (VSV) y el virus del sarampión y en el tipo desnudo del tipo 1 del virus de la poliomielititis y en el tipo desnudo del tipo 5 del adenovirus.

50 El documento de patente de Estados Unidos N° 4.783.446 divulga una actividad antiviral del iota, kappa y lambda carragenano contra la infección retroviral, particularmente contra la infección del virus de la leucemia de la célula T humana (HTLV III).

El documento de patente internacional WO 88/06396 divulga un método para el tratamiento de infecciones retrovirales, incluyendo la infección con el VIH, administrando un carragenano o una mezcla de carragenanos.

Girond et al. (1991, Research Virol. 142, 261-270) dan a conocer que los polisacáridos sulfatados tales como el iota, kappa y lambda carragenano tienen una actividad inhibidora eficaz contra la replicación del virus de la hepatitis A (HAV).

Baba M. et al. (1988, Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1742-1745) describen varios polisacáridos sulfatados incluyendo el sulfato de dextrano, polisulfato de pentosano, fucoidan y carragenina como potentes inhibidores de HSV-1, HSV-2, citomegalovirus humano (CMV), virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus Sindbis y VIH-1. Por otra parte, estos polisacáridos sulfatados fueron probados como inactivos contra el virus Coxsackie, virus de la polio y virus de la parainfluenza.

El documento de patente europea EP 0293826 describe la aplicación terapéutica y profiláctica de polisacáridos sulfatados tales como el fucoidán y los carragenanos para inhibir el VIH-1 *in vitro*.

El documento de patente de Estados Unidos N° 5.658.893 describe un método para inhibir la infección por rotavirus de células humanas poniendo en contacto el rotavirus con el lambda carragenano. Se describe además que el iota y kappa carragenano no mostraron actividad anti-rota viral.

El documento de patente de Estados Unidos N° 2003/181415 A describe que los polisacáridos sulfatados, incluyendo el sulfato de celulosa, son conocidos como eficaces contra varios virus con envoltura, y en particular contra el virus del herpes simple (HSV), virus del papiloma y el VIH.

El documento de patente de Japón JP 11080003 A describe el uso de polisacáridos sulfatados tales como por ejemplo, el carragenano para el tratamiento de varias infecciones bacterianas y virales, incluyendo infecciones causadas por el virus de la influenza, en los seres humanos, animales de granja y animales domésticos.

El fucoidán es un polisacárido sulfatado que se extrae principalmente de varias especies de algas marrones. Hay dos tipos de grado farmacológico de fucoidanos disponibles en el mercado, una fracción de fucoidán de alto peso molecular (HMWF) que tiene un peso molecular medio en el intervalo de aproximadamente 1.000.000 a 2.000.000 Da (por ejemplo Kraeber, Alemania) y una fracción de fucoidán de bajo peso molecular (LMWF) que tiene un peso molecular medio de 8.200 Da. El F-fucoidán se compone principalmente de ésteres sulfatados de fucosa, mientras que el U-fucoidán comprende aproximadamente 20% de ácido glucurónico.

Carragenano es un término genérico para polisacáridos lineales sulfatados basados en galactosa extraídos de algas (Rhodophyceae). Se utilizan principalmente como un espesante, agente gelificante, estabilizador o emulsionante en productos farmacéuticos y alimentarios. Existen más de 10 carragenanos estructuralmente diferentes, su naturaleza depende del género de algas marinas de las que se extraen. Los tres tipos principales son el iota, kappa y lambda carragenano, que difieren ligeramente en su estructura y grado de sulfatación. El iota carragenano es un galactano sulfatado que forma una gel blanda predominantemente extraído de las algas rojas *Gigartina stellata* y *Chondrus crispus*. El kappa carragenano produce geles fuertes y rígidos, y se produce predominantemente a partir de la *Kappaphycus cottonii*. El lambda carragenano, que es la forma más común, es frecuentemente usado para espesar productos lácteos.

A pesar del mucho tiempo que se ha conocido la actividad antiviral de los carragenanos contra virus tales como, por ejemplo, VIH, HSV, HAV, HTLV, o VPH, el mecanismo de cómo los carragenanos muestran actividad antiviral todavía necesita más aclaraciones.

Por ejemplo, Baba M. et al. (1988, Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1742-1745) especulan que los polisacáridos sulfatados, incluyendo el kappa y lambda carragenano inhiben o al menos contribuyen a la inhibición de la adsorción del virus de varios virus con envoltura a la superficie de la célula hospedante. De manera similar, el documento de patente de Estados Unidos N° 2005/0261240 asume que el carragenano puede unirse de forma no específica a un virus bloqueando de este modo los sitios receptores del virus. Damonte EB et al. (2004, Curr. Med. Chem. 11, 2399-2419) describen que los polisacáridos sulfatados pueden imitar al sulfato de heparina celular y por lo tanto bloquear los sitios receptores virales responsables de la interacción inicial entre el virus y la célula hospedante, mientras que González M. E. et al. (1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31, 1388-1393) encontraron, utilizando partículas de viriones etiquetados, que viriones de HSV-1 son internalizados incluso en presencia de altas concentraciones del iota carragenano. Ellos sugieren que al menos para el HSV-1, el carragenano inhibe una etapa en la replicación del virus con posterioridad a la fijación del virus y entrada en la célula, pero todavía antes de la síntesis de proteínas virales tardías.

Turner EV y Sonnenfeld G. (1979, Infection and Immunity 25, 467-469) describen una actividad antiviral del lambda pero no del kappa carragenano contra el virus de la estomatitis vesicular bovina, dicha actividad antiviral es debida a la inmunomodulación, es decir, a la inducción de interferón.

En conclusión, puede resumirse tomando las palabras del documento de patente de Estados Unidos Nº 5.658.893, que *"en vista de las diferentes respuestas de diferentes virus a polisacáridos sulfatados, es evidente que la respuesta de un virus en particular al carragenano no se puede predecir con certeza sin experimentación. El mecanismo por el que los polisacáridos sulfatados, en especial los carragenanos, inhiben la replicación viral y la infectividad puede no ser uniforme puesto que diferentes investigadores han divulgado resultados contradictorios cuando se trabaja con diferentes virus y tipos de células. No sería obvio para un experto en la técnica que una sustancia tal como un polisacárido sulfatado que es un inhibidor eficaz de un virus demostrara una eficacia similar contra otro virus"*.

A la luz de lo anterior, la presente invención proporciona ahora una composición antiviral basada en el carragenano adecuada para el tratamiento profiláctico o terapéutico de las infecciones respiratorias virales causadas por miembros de la familia Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae y/o familias Adenoviridae. Contrariamente a la divulgación de Fujisawa H. et al. (1987, J. Gen. Virol. 68, 425-423), que informan que la administración intranasal de carragenano no redujo el título de virus de la influenza A en ratones, sino que por el contrario incluso mejoró la susceptibilidad de los animales al virus dependiendo de la cantidad de virus usada para la infección, se ha encontrado ahora sorprendentemente que el carragenano, en particular el iota y kappa carragenano, tienen de hecho eficacia antiviral contra varios miembros de las familias Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Adenoviridae y Coronaviridae.

Adicionalmente, se encontró sorprendentemente que el fucoidán, en particular la fracción de fucoidán de alto peso molecular (HWMF), tiene eficacia antiviral contra varios miembros de las familias Orthomyxoviridae y Paramyxoviridae.

En consecuencia, la presente invención tiene por objeto proporcionar una composición farmacéutica antiviral adecuada para la prevención o el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio causadas por un virus seleccionado del grupo que consiste de ortomixovirus, paramixovirus y adenovirus, así como para las enfermedades o condiciones patológicas asociadas con tales infecciones primarias virales, tales enfermedades o condiciones comprenden infecciones virales o bacterianas secundarias así como los síntomas corporales típicamente asociados con cualquiera de tales infecciones primarias o secundarias incluyendo síntomas tales como fiebre, dolor, mareos, escalofríos, sudoración, y/o deshidratación.

Descripción de la invención

En una primera realización, la presente invención se refiere al uso del carragenano como un ingrediente activo antiviral en la fabricación de una composición farmacéutica para la profilaxis o tratamiento de un estado patológico o enfermedad causada por o asociada con una infección por un virus respiratorio, en donde dicho virus respiratorio comprende al menos una proteína unida a o integrada en su membrana viral, la proteína es capaz de unirse a una célula hospedante a través de un receptor que tiene al menos un resto de azúcar, el virus respiratorio se selecciona de entre el grupo que consiste en el virus de la influenza A humana y virus paramixovirus y el carragenano es el iota y, opcionalmente, el kappa carragenano.

Una "célula hospedante" como se refiere en la presente memoria es cualquier célula eucariota que es naturalmente, es decir, en condiciones naturales o como naturales, dirigida y penetrada por cualquiera de los virus mencionados en lo sucesivo. Para fines experimentales y de laboratorio, es estado de la técnica el uso de líneas de células hospedantes que son típicamente reconocidas como modelos in vitro adecuados para probar la eficacia de agentes fisiológicamente activos y que permiten por lo menos cierto grado de predictibilidad de los resultados con respecto a las aplicaciones comparables humanas.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el iota, y, opcionalmente, el kappa carragenano como un principio activo antiviral y a las aplicaciones del mismo en la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por o asociadas con un virus que entra en el cuerpo de un individuo vía el tracto respiratorio, en donde dicho virus comprende por lo menos una proteína unida a o integrada en su membrana viral, la proteína es capaz de unirse a una célula hospedante a través de un receptor que tiene al menos un resto de azúcar, y el virus se selecciona del grupo que consiste en el virus de la influenza A humana y el virus paramixovirus.

El término "ingrediente activo antiviral" tal como se utiliza en esta memoria se refiere a un compuesto que es directa o indirectamente eficaz en específicamente interferir con al menos una acción viral seleccionada del grupo que consiste en la penetración del virus en células eucariotas, la replicación del virus en células eucariotas, montaje del virus, y liberación del virus de las células eucariotas, o que es eficaz en la inhibición inespecífica del aumento del título del virus o la reducción inespecífica del nivel de título de virus en un sistema hospedante eucariota o de mamífero. También se refiere a un compuesto que previene o reduce la probabilidad de contraer una infección viral.

La composición farmacéutica presente puede administrarse, como sea el caso, antes o después de la aparición de una infección viral, es decir, para propósitos de tratamiento profiláctico o terapéutico, o para la administración, tanto profiláctica como terapéutica.

El término "profilaxis" o "tratamiento profiláctico" como se usa en esta memoria se refiere a la administración de la presente composición farmacéutica a un individuo sano con el fin de reducir la susceptibilidad de dicho individuo a una infección viral.

5 El término "tratamiento" o "tratamiento terapéutico" como se usa en esta memoria se refiere a la administración de la presente composición farmacéutica a fin de lograr una reducción en la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, la eliminación de los síntomas y/o causa subyacente, la prevención de la aparición de síntomas y/o su causa subyacente, y/o la mejora o reparación de los daños causados directamente por o asociados indirectamente, por ejemplo a través de una infección secundaria, con la infección viral.

10 Se sabe que los virus ortomixovirus y paramixovirus y otros virus se adhieren a la célula hospedante a través de la unión a receptores presentes en la superficie de la célula hospedante, los receptores típicamente son glicoproteínas o glicolípidos que contienen restos de azúcar incluyendo el ácido siálico (ácido N-actil neurámico) y restos de heparán sulfato.

15 En el caso de los ortomixovirus, por ejemplo, el virus de la influenza, los viriones se unen a restos de ácido siálico. El virus de la influenza humana preferentemente se unen a restos de ácido siálico que tienen un enlace alfa 2-6, mientras que el virus de la influenza aviar preferentemente se unen a restos de ácido siálico con enlace alfa 2-3.

20 La captación celular de un paramixovirus implica al menos a dos de sus glicoproteínas integrales de membrana. Una de ellas, que normalmente se selecciona del grupo de glicoproteínas HN, H y G, está implicada en la unión celular y la otra glicoproteína, por ejemplo, la glicoproteína F, está implicada en la mediación de la fusión independiente del pH de la envoltura viral con la membrana de la célula hospedante. Por ejemplo, los respiravirus y rubulavirus se unen a restos de ácido siálico de las glicoproteínas o glicolípidos de receptores de las células hospedantes.

La unión del VSR no se entiende completamente pero lo más probable es que la unión a la célula hospedante implique la interacción con sulfato de heparano, un glucosaminoglicano que es parte de la matriz extracelular.

25 Junto con la revelación de la presente invención se ha observado *in vitro* que la exposición de las células hospedantes al carragenano, en particular, al iota y/o kappa carragenano, puede alterar la estructura de la superficie celular de dicha célula hospedante, presumiblemente causando cambios conformacionales en la estructura tridimensional de ciertos receptores de la superficie celular o por enmascaramiento y/o modificación de dichos receptores.

30 Sorprendentemente, este cambio en la superficie de la célula hospedante impide a los ortomixovirus y paramixovirus unirse a las células hospedantes, incluso después de la eliminación del carragenano de las células hospedantes, es decir, en ausencia del carragenano en el momento de la activación artificial de una infección por inoculación *in vitro*.

Este efecto antiviral específico del carragenano se observó siempre que la infección provocada artificialmente se iniciara no más tarde de aproximadamente dos horas después de retirar el polímero de las células hospedantes, lo que indica un efecto de duración relativamente larga de los cambios estructurales en la superficie celular causados por la interacción con el carragenano.

35 Por el contrario con los paramixovirus y ortomixovirus, no se observó un efecto protector en la ausencia del carragenano en el momento del inicio de la infección para otros virus incluyendo los rinovirus y coronavirus, con los que la protección se logró sólo en presencia del carragenano.

40 Por lo tanto y en vista de la eficacia antiviral probada experimentalmente del carragenano contra la infección por rinovirus, se concluye que en el caso del rinovirus y probablemente otros virus también, el efecto antiviral puede ser debido a la unión del polímero de carragenano a los viriones más que a una interacción química o física del polímero con los receptores de la célula hospedante.

45 Como se ha mencionado en esta memoria anteriormente, las composiciones de carragenano de la presente invención pueden aplicarse exitosamente contra la infección del virus de la influenza A, en donde dicho virus de la influenza A es un virus humano que se une a una célula hospedante a través de un enlace 2-6 de ácido siálico. Las infecciones del virus de la influenza A se tratan mejor usando predominantemente o exclusivamente iota carragenano como principio activo antiviral.

Las especies de paramixovirus encontradas que son susceptibles al tratamiento de iota carragenano se seleccionan del grupo que consiste en el virus de la parainfluenza humana (VPH) tipo 1, VPH tipo 2, VPH tipo 3, VPH tipo 4 y VSR.

50 Las condiciones patológicas o enfermedades mencionadas en la presente memoria en relación con la administración profiláctica o terapéutica del iota carragenano comprenden la bronquitis aguda, bronquitis crónica, rinitis, sinusitis, laringitis, bronquiolitis aguda, faringitis, amigdalitis, laringitis, traqueítis, asma y neumonía. El carragenano es especialmente adecuado para aplicación tópica para tratar la inflamación de la piel o inflamación de la mucosa. El

carragenano útil para aplicación tópica a la piel o la mucosa de acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15.000 a 5.000.000 Da, las fracciones que tienen pesos moleculares de más de 50.000 Da, y especialmente fracciones que tienen pesos moleculares medios en el intervalo de 50.000 a 3.000.000 Da son particularmente preferidas.

- 5 La administración sistémica, por ejemplo, parenteral u oral es también posible, especialmente utilizando polímeros de peso molecular bajo que tienen un peso molecular medio en el intervalo de 15.000 a 100.000 Da.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención ajustada para uso parenteral puede ser proporcionada como una preparación seleccionada del grupo de lociones para la piel, cremas, pomadas, geles, polvos, incluyendo polvos para inhalación, aerosoles, espumas, gotas líquidas o soluciones para gárgaras. Las preparaciones del iota carragenano pueden, sin embargo ajustarse también para la administración oral, por ejemplo como soluciones líquidas o preparaciones semisólidas o sólidas tales como polvos secos, comprimidos, cápsulas, grageas o cualquier otra forma galénica para su ingestión por vía oral. Las composiciones farmacéuticas para aplicación a la mucosa incluyen aerosoles o gotas nasales y cualquier otro sistema nasal de suministro de fármacos conocido en la técnica tales como los descritos, por ejemplo, en el documento de patente de Estados Unidos N° 6.391.452.

20 Cuando la composición es para uso tópico y es líquida o semi-sólida comprende típicamente en su forma lista para uso el iota carragenano en una cantidad de entre 0,01 y 10%, preferiblemente entre 0,01 y 5%, más preferiblemente entre 0,1 y 2% en peso, en relación al volumen total de la composición. Cuando la composición es sólida comprende típicamente en su forma lista para uso el iota carragenano en una cantidad de entre 0,01 y 10%, preferiblemente entre 0,01 y 5%, más preferiblemente entre 0,1 y 2% en peso en relación al peso total de la composición.

Los carragenanos útiles en la presente invención están disponibles comercialmente, pero también puede ser preparados por extracción a partir de plantas de algas marinas de conformidad con los procedimientos de extracción conocidos en la técnica.

25 Si no se indica lo contrario, el término "carragenano" como se utiliza en esta memoria se refiere al iota y, opcionalmente, al kappa carragenano. El carragenano de la presente invención puede además ser un homopolímero o un heteropolímero. Un homopolímero de iota carragenano se construye de subunidades de sólo iota carragenano, mientras que un heteropolímero de carragenano comprende subunidades de iota y de kappa carragenano.

30 Una "mezcla" de los carragenanos por lo tanto puede también referirse a una composición de materia que comprende una mezcla de diferentes subunidades de carragenanos como parte de al menos un carragenano heteropolímero presente en dicha composición.

Típicamente, las composiciones antivirales farmacéuticas según la presente invención están sustancialmente libres de carragenanos que no sean el iota y el kappa carragenano.

35 Para algunas aplicaciones, la composición está sustancialmente compuesta únicamente de iota carragenano, mientras que para otras aplicaciones, la composición puede comprender más de 50%, preferiblemente más de 70%, y especialmente hasta más de 95% (p/p) en peso seco de iota carragenano, en relación al peso total de todos los carragenanos presentes en la composición.

Cuando la composición comprende al menos un carragenano heteropolímero los valores numéricos dados anteriormente se refieren a los porcentajes de las respectivas subunidades de carragenano.

40 Las composiciones de carragenano antivirales según la presente invención pueden además comprender al menos un vehículo y/o aditivo farmacéuticamente aceptables adecuados y permitidos para la aplicación médica.

45 El vehículo puede ser un diluyente, por ejemplo, agua, solución salina, opcionalmente tamponada con fosfato (PBS), un excipiente, o cualquier otro vehículo que facilite la administración de la composición. Cuando la composición es sólida, semi-sólida o líquida los grupos de vehículos y aditivos, respectivamente, pueden comprender, pero no se limitan a SiO₂, TiO₂, un aglutinante tal como la celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, goma tragacanto, gelatina, almidón, lactosa, monohidrato de lactosa, ácido alginico o almidón de maíz; un lubricante o tensioactivo como el estearato de magnesio o laurilsulfato de sodio; un agente de deslizamiento como por ejemplo dióxido de silicio coloidal; y un agente edulcorante tal como la sacarosa o sacarina.

50 Todavía otros aditivos se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en conservantes fisiológicamente aceptables, sales de metales alcalinos farmacéuticamente aceptables, tales como los cloruros de sodio, potasio, litio o amonio, tampones o agentes de ajuste del pH tales como el ácido cítrico, ácido acético, ácido fumárico, ácido clorhídrico, ácido málico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido sulfúrico y ácido tartárico, y combinaciones de dichos ácidos.

Para muchas aplicaciones es útil que la composición comprenda cloruro de sodio como aditivo.

ES 2 406 684 T3

Típicamente, una sal farmacéuticamente aceptable está presente en la composición en una cantidad de no más de 1%, preferiblemente no más de 0,6% (p/v).

En las composiciones de la presente invención el iota carragenano mismo puede estar presente como una sal, también, preferiblemente en forma de una sal de sodio.

- 5 Se prefiere que las presentes composiciones para aplicaciones médicas profilácticas o terapéuticas se proporcionen como preparaciones estériles, libres de gérmenes, libres de patógenos, libres de pirógenos y/o libres de alérgenos.

Se encontró que el carragenano no era tóxico en la administración oral o dérmica, o después de su inhalación, incluso cuando se aplica a dosis extremadamente altas. Fue clasificado por lo tanto como "generalmente reconocido como seguro" (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

- 10 El iota carragenano también se puede usar como un agente antiviral eficaz contra las infecciones por ortomixovirus y paramixovirus en varios medicamentos junto con otros compuestos fisiológicamente activos o fármacos como ingredientes activos principales, en donde el papel del iota carragenano incluye su uso como vehículo o como aditivo tal como emulsionante o agente modificador de la viscosidad. Es compatible con la mayoría de las preparaciones farmacéuticas sin causar efectos secundarios no deseados.

- 15 Está por lo tanto dentro del alcance de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden el iota carragenano como un aditivo, más específicamente eficaz como un antiviral, en particular anti-paramixoviral o anti-virus humano de la influenza A, adyuvante a medicamentos que son típicamente aplicados en la profilaxis o terapia de enfermedades infecciosas y/o inflamatorias, alergias y/o condiciones de un sistema inmune deteriorado o suprimido. En particular, está dentro del alcance de la presente invención usar el iota carragenano como un adyuvante eficaz antiviral de la influenza en combinación con medicamentos útiles en la profilaxis o terapia de enfermedades infecciosas y/o inflamatorias, alergias y/o condiciones de un sistema inmune deteriorado o suprimido.

- 20 Se observó que el carragenano puede tener también actividad inmuno-moduladora, particularmente actividad de fortalecimiento del sistema inmune. Todavía no está claro, sin embargo, si esta actividad está directamente asociada con una interferencia fisiológica de la sustancia o indirectamente a través de su eficacia antiviral.

- 25 La composición de la presente invención generalmente se formulará en preparaciones para uso tópico o en mucosas, preferiblemente seleccionadas de los aerosoles, en particular aerosoles nasales, polvos, gotas, soluciones para gárgaras, espumas, geles, cremas, ungüentos, lociones, pastillas, y similares. Sin embargo, la composición farmacéutica de la presente invención también pueden estar recubriendo superficies sólidas de artículos de higiene o sanitarios tales como, por ejemplo, artículos de higiene facial o artículos de limpieza que se utilizan normalmente en las zonas oral y/o nasal, incluyendo pero sin limitarse a tejidos o papeles nasales, y pañuelos.

- 30 Más específicamente, la composición farmacéutica se puede aplicar, por ejemplo, rociada – mucho como los desinfectantes - en tejidos de higiene, guantes o papeles, incluidos los tejidos nasales o papeles, con el fin de ejercer un efecto viricida al menos en cierta medida, contribuyendo así a reducir la auto-infección repetida de un individuo por los dedos contaminados y también para reducir la distribución viral entre diferentes individuos que estén en estrecho contacto, por ejemplo, de mano a mano, unos con otros.

- 35 Otros elementos recubiertos, impregnados o empapados con una composición farmacéutica basada en el iota carragenano comprenden hisopos de algodón, máscaras antipolvo o máscaras faciales sanitarias o médicas. Incluso barras de labios se pueden formular para contener una cantidad antiviral eficaz del iota carragenano. Estos artículos de higiene o saneamiento se pueden utilizar profilácticamente o para el tratamiento terapéutico contra una infección viral y pueden ayudar en la prevención o la reducción del riesgo de infección.

- 40 Es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones antivirales basadas en el carragenano para la profilaxis o tratamiento terapéutico de personas especialmente susceptibles a, o en riesgo aumentado de infección por ortomixovirus o paramixovirus incluyendo pacientes de alto riesgo seleccionados entre el grupo que consiste en pacientes de EPOC, pacientes de asma, personas que sufren de alergias, o de problemas del sistema inmunológico, cardíaco o pulmonar, y los pacientes de trasplantes.

- 45 De acuerdo con la presente invención el iota-carragenano también puede ser utilizado como un ingrediente antiviral activo en la fabricación de una composición farmacéutica para la profilaxis o el tratamiento terapéutico de un estado patológico o enfermedad causado por o relacionado con una infección por un virus respiratorio que es un adenovirus, el adenovirus preferentemente es un adenovirus de tipo B (Ad50).

50 Las infecciones por adenovirus son tratadas mejor usando composiciones en las que el iota carragenano es el único o principal ingrediente activo antiviral.

ES 2 406 684 T3

Las pruebas experimentales confirmaron además que también el fucoidán es útil aplicado como un ingrediente activo antiviral en la fabricación de una composición farmacéutica eficaz para la profilaxis o el tratamiento de condiciones patológicas o enfermedades causadas por o asociadas con una infección por un virus respiratorio, el virus respiratorio se selecciona del grupo que consiste en ortomixovirus y paramixovirus. En este contexto, el ortomixovirus es típicamente el virus de la influenza A o B, y el paramixovirus es típicamente VSR.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la eficacia del iota carragenano en la reducción de la formación de placas de virus de la influenza A/Chile/1/93 H1N1 en células MDCK a diferentes dosis en el intervalo de una concentración final de 0,1 a 100 µg/ml.

10 Ordenada = porcentaje de la formación de placas después de la infección de las células MDCK con la suspensión de virus de la influenza A/Chile/1/93 H1N1 que contenía diferentes concentraciones del iota carragenano en relación con la formación de placa de células MDCK infectadas con la suspensión de virus de la influenza A/Chile/1/93 H1N1 sin iota carragenano (como 100%); abscisa = diferentes concentraciones finales del iota-carragenano en la suspensión de virus en µg/ml.

15 La figura 2 muestra la eficacia del iota carragenano en la reducción de la formación de placas de virus de la influenza A/Aichi2/68 H3N2 en células MDCK a diferentes dosis en el intervalo de una concentración final de 75 a 300 µg/ml.

20 Ordenada = porcentaje de la formación de placas después de la infección de las células MDCK con la suspensión de virus de la influenza A/Aichi2/68 H3N2 que contenía diferentes concentraciones del iota carragenano en relación con la formación de placa de células MDCK infectadas con la suspensión de virus de la influenza A/Aichi2/68 H3N2 sin iota carragenano (como 100%); abscisa = diferentes concentraciones finales del iota-carragenano en la suspensión de virus en µg/ml.

La figura 3 muestra la eficacia del iota carragenano en la reducción de la formación de placas de virus de la parainfluenza 3 en células Hep-2 a diferentes dosis en el intervalo de una concentración final de 0,1 a 100 µg/ml.

25 Ordenada = porcentaje de la formación de placas después de la infección de las células Hep-2 con la suspensión de virus de la parainfluenza 3 que contenía diferentes concentraciones del iota carragenano en relación con la formación de placa de células Hep-2 infectadas con la suspensión de virus de la parainfluenza 3 sin iota carragenano (como 100%); abscisa = diferentes concentraciones finales de iota-carragenano en la suspensión de virus en µg/ml.

30 La figura 4 muestra la eficacia del iota carragenano en la reducción de la formación de placas de virus de la parainfluenza 3 en células HeLa a diferentes dosis en el intervalo de una concentración final de 13 a 400 µg/ml.

35 Ordenada = porcentaje de la formación de placas después de la infección de las células HeLa pretratadas (preincubación durante 3 horas con el iota carragenano; posterior eliminación del polímero) con la suspensión de virus de la parainfluenza 3 en relación con la formación de placas de células HeLa no tratadas (sin la preincubación con iota carragenano) (como 100%); abscisa = diferentes concentraciones finales del iota-carragenano en el medio de preincubación en µg/ml. C = células preincubadas con carboximetilcelulosa polímera (control negativo).

La figura 5 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por un coronavirus en células de riñón de gato (CK).

40 Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de carragenano en la suspensión de virus (figura 5A) o en el medio de preincubación (figura 5B) en µg/ml; figura 5A = células infectadas con el coronavirus felino FIP en presencia del iota, kappa o lambda carragenano;

figura 5B = células preincubadas durante 3 horas con iota, kappa o lambda carragenano, posteriormente lavadas tres veces con PBS e infectadas con el coronavirus felino FIP en ausencia del polímero.

45 La figura 6 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por HRV8 en células HeLa. Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota carragenano en la suspensión de virus (figura 6A) o en el medio de preincubación (figura 6B) en µg/ml; figura 6A = células infectadas con rinovirus humano tipo 8 (HRV8) en presencia de iota-carragenano; figura 6B = células preincubadas durante 3 horas con iota carragenano, posteriormente lavadas tres veces con PBS e infectadas con HRV8 en ausencia del iota carragenano.

50

ES 2 406 684 T3

La figura 7 muestra la unión del iota carragenano marcado con FITC a las células HeLa después de lavados sucesivos con PBS.

5 Ordenada = iota carragenano calculado en $\mu\text{g/ml}$ (conversión de unidades fluorescentes de luz a $\mu\text{g/ml}$ utilizando una curva estándar); abscisa = etapas de lavado de las células con PBS; 0 = sobrenadante que contiene iota carragenano marcado con FITC se elimina de las células; 1 = primera etapa de lavado de las células con PBS, 2 = segunda etapa de lavado de las células con PBS; 3 = tercera etapa de lavado de las células con PBS.

La figura 8 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por VSR en células Vero.

10 Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota carragenano en la suspensión de virus (barras oscuras) o en el medio de preincubación (barras claras) en $\mu\text{g/ml}$; barras oscuras = células infectadas con VSR en presencia del iota carragenano; barras claras = células preincubadas durante 3 horas con iota carragenano, posteriormente lavadas tres veces con PBS e infectadas con VSR en ausencia del iota carragenano.

15 La figura 9 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por VSR en células HNep.

Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección y 5 días de incubación respecto a las células control no infectadas; abscisa = tiempos de adición del iota carragenano en una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ al medio de incubación (horas después de la infección).

20 La figura 10 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por VSR en células HNep.

Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección y 5 días de incubación respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota carragenano en la suspensión de virus en $\mu\text{g/ml}$.

25 La figura 11 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por VSR en células HEp-2.

Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección y 6 días de incubación a 37° C respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota, kappa o lambda carragenano en la suspensión de virus en $\mu\text{g/ml}$.

30 La figura 12 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por VSR en células HNep.

Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota carragenano (barras oscuras) y fucoidán (barras claras) en la suspensión de virus en $\mu\text{g/ml}$.

35 La figura 13 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por el virus de la parainfluenza 3 en células HNep.

Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota, kappa o lambda carragenano o fucoidán en la suspensión de virus en $\mu\text{g/ml}$.

40 La figura 14 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por el virus de la influenza H3ND (FLU) en células HNep.

Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota, kappa y lambda carragenano o fucoidán en la suspensión de virus en $\mu\text{g/ml}$.

45 La figura 15 muestra la eficacia del iota, kappa, y lambda carragenano y fucoidán en la reducción de la formación de placas de virus de la influenza A H5N1 en células MDCK a dosis de 400 $\mu\text{g/ml}$ y 44 $\mu\text{g/ml}$.

Ordenada = porcentaje de la formación de placas después de la infección de las células MDCK con la suspensión de virus de la influenza aviar H5N1 que contenía concentraciones diferentes de iota, kappa, lambda carragenano o fucoidán en relación con la formación de placas de células MDCK infectadas con la suspensión de virus de la

influenza aviar H5N1 sin polímero (como 100%); abscisa = diferentes concentraciones finales del iota, kappa, lambda carragenano o fucoidán en la suspensión de virus en µg/ml.

La figura 16 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por un adenovirus tipo 50 en células HNep.

- 5 Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota carragenano en la suspensión de virus en µg/ml.

La figura 17 muestra los resultados de un experimento de inhibición de la muerte celular inducida por un Ad50 en células HNep.

- 10 Ordenada = porcentaje de células no infectadas después de la infección respecto a las células control no infectadas; abscisa = concentraciones finales diferentes de iota carragenano en la suspensión de virus (barras oscuras) o en el medio de preincubación (barras claras) en µg/ml; barras oscuras = células infectadas con Ad50 en presencia del iota carragenano; barras claras = células preincubadas durante 3 horas con iota carragenano, posteriormente lavadas tres veces con PBS e infectadas con Ad50 en ausencia del iota carragenano.

- 15 Con el fin de que la invención descrita en la presente memoria puede ser entendida más completamente, se exponen los siguientes ejemplos. Los ejemplos son para fines ilustrativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes de esta invención en ningún aspecto. Se entiende además que la presente invención también comprenderá variaciones de las realizaciones descritas expresamente en una medida como se contemplaría por una persona con experiencia ordinaria en la técnica.

Ejemplos

- 20 **Ejemplo 1:** Efecto de diferentes concentraciones de iota carragenano sobre la formación de placas de virus de la influenza A en células MDCK

25 Suspensiones de virus que contenían 60-80 pfu (unidades formadoras de placas) de virus de la influenza A/Chile/1/93 H1N1 se mezclaron con una solución madre de iota carragenano a concentraciones finales de 0,1, 1, 10, 25, 50 o 100 µg/ml. Monocapas confluentes de la línea celular de riñón canino MDCK en placas de seis pocillos fueron infectadas con las suspensiones del virus durante 60 minutos a 34° C. El inóculo de infección se retiró y las células se lavaron con PBS y se añadió agarosa sobrenadante que contenía 0,6% de agarosa. Las placas se incubaron a 36° C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ en aire. 48-60 horas después de la infección la capa de agarosa sobrenadante se eliminó, las células se tiñeron con violeta cristal y las placas visibles se contaron. Se determinó el porcentaje de formación de placas en relación con el control infectado (sin tratamiento de iota carragenano) para cada concentración de iota carragenano.

30 Como se muestra en la figura 1, se encontró que el iota carragenano inhibe de una manera dependiente de la dosis la formación de placas del virus de la influenza A/Chile/1/93 H1N1 en células MDCK. Se consiguió una reducción del 50% en el número de placas (IC50) a una concentración de iota carragenano de 50 µg/ml.

- 35 **Ejemplo 2:** Efecto de diferentes concentraciones de iota-carragenano en la formación de placas del virus de la influenza A en células MDCK

40 Suspensiones de virus que contenían 60-80 pfu de virus de la influenza A/Aichi2/68 H3N2 se mezclaron con una solución madre de iota carragenano a la concentración final de 75, 150 o 300 µg/ml. Monocapas confluentes de la línea celular de riñón canino MDCK en placas de seis pocillos fueron infectadas con las suspensiones de virus durante 60 minutos a 34° C. El inóculo de infección se retiró y las células se lavaron con PBS y se añadió agarosa sobrenadante que contenía 0,6% de agarosa. Las placas se incubaron a 37° C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ en el aire. 48-60 horas después de la infección la capa de agarosa sobrenadante se eliminó, las células se tiñeron con violeta cristal y las placas visibles se contaron. El porcentaje de formación de placas con relación al control infectado (sin iota carragenano) se determinó para cada concentración de iota carragenano.

45 Como se muestra en la Figura 2, se encontró que el iota carragenano inhibe, de una manera dependiente de la dosis, la formación de placa del virus de la influenza A/Aichi/2/68 H3N2 en células MDCK.

Ejemplo 3: Efecto de diferentes concentraciones de iota-carragenano en la formación de placas del virus de la parainfluenza 3 en células Hep-2

50 Suspensiones de virus que contenían 60-80 pfu de virus de la parainfluenza 3 se mezclaron con una solución madre de iota carragenano a concentraciones finales de 0,1, 1, 10, 25, 50 y 100 µg/ml. La mezcla se incubó durante 1 hora a 34° C. Monocapas confluentes de células HEp-2 en placas de seis pocillos fueron infectadas con las suspensiones de virus durante 60 minutos a 34° C. El inóculo de la infección se retiró y las células se lavaron con PBS y se añadió

la capa sobrenadante de agarosa que contenía 0,6% de agarosa. Las bandejas se incubaron en una atmósfera humidificada, 5% de atmósfera de CO₂. 48-60 horas después de la infección la agarosa sobrenadante se eliminó, las células se tiñeron con violeta cristal y las placas visibles se contaron. El porcentaje de formación de placas en relación con el control infectado (sin iota carragenano) se determinó para cada concentración de iota carragenano.

- 5 Como se muestra en la Figura 3, se encontró que el iota carragenano inhibe, de una manera dependiente de la dosis, la formación de las placas de virus de parainfluenza 3 en células Hep-2. Una reducción del 50% en el número de placas (IC₅₀) se alcanzó a una concentración de iota carragenano de 10 µg/ml.

Ejemplo 4: Efecto de la preincubación con iota-carragenano en la formación de placas del virus de la parainfluenza 3 en células HeLa

- 10 Monocapas confluentes de células HeLa se incubaron tres horas con iota-carragenano a una concentración de 13, 40, 133 y 400 µg/ml. El sobrenadante que contenía iota carragenano se eliminó y las células se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se infectaron con el virus de la parainfluenza 3, como se describe en el Ejemplo 3, pero sin la adición de iota carragenano a la suspensión de virus. El porcentaje de formación de placas con relación al control infectado (sin tratamiento previo de iota carragenano) se determinó para cada concentración de iota carragenano.

- 15 Como se muestra en la Figura 4, se encontró que el iota carragenano inhibe la formación de placas del virus de la parainfluenza 3 a una concentración de 400 y 133 µg/ml cuando las células se preincubaron durante tres horas con iota-carragenano, aunque ningún iota-carragenano estaba presente en el momento de la infección y durante el período completo de incubación posterior a 37° C. Este resultado indica que el iota carragenano química o estructuralmente modifica los receptores de la superficie de la célula hospedante en una forma tal que la unión mediada por el receptor del virus de la parainfluenza 3 a la célula hospedante es obstaculizada o impedida, incluso en ausencia del agente de modificación, el carragenano. Esta es también una prueba de una fuerte eficacia profiláctica del iota carragenano.

- 20 Ejemplo 5: Efecto del pretratamiento de células eucariotas por carragenanos diferentes en la inhibición de la muerte celular mediada por coronavirus

- 25 Células subconfluentes CK fueron infectadas en presencia de iota, kappa o lambda carragenano a una concentración de 4, 40 y 400 µg/ml con coronavirus felino FIPV a una moi (multiplicidad de infección) de 0,1 (véase la figura 5A). En comparación, Células subconfluentes CK se incubaron tres horas con iota, lambda o kappa carragenano en una concentración de 4, 40, y 400 µg/ml. El sobrenadante que contenía carragenano se retiró y las células se lavaron tres veces con PBS y se infectaron con coronavirus felino FIP (moi = 0,1) en ausencia del polímero (véase la figura 5B). El porcentaje de células viables en relación con el control no infectado se determinó para cada carragenano y cada concentración.

- 30 Como se muestra en la Figura 5A, los tres tipos de carragenano inhiben la muerte celular en células CK mediada por coronavirus a la mayor concentración de 400 µg/ml. El iota carragenano todavía muestra una inhibición significativa a una concentración de 4 µg/ml, mientras que el kappa y lambda carragenano no son eficaces a esta concentración. De la Figura 5B se puede deducir que al contrario que con los virus que entran en la célula a través de receptores de azúcar (véanse los ejemplos anteriores), la infección de coronavirus no parece ser inhibida debido a una modificación química o estructural del receptor(es) específicos del coronavirus en la superficie de la célula hospedante por el carragenano, ya que no fue posible aumentar la protección de la célula hospedante más allá de un nivel del 35% de inhibición incluso a la mayor concentración de carragenano experimental de 400 µg/ml y con un periodo de preincubación de tres horas. Ni tampoco el pretratamiento de las células hospedantes con carragenano mejoró significativamente la protección de la célula contra la infección por coronavirus. Los resultados sugieren que con el fin de lograr una protección significativa contra la infección por coronavirus el agente activo antiviral, es decir, el carragenano, debe estar presente en el momento de la infección, es decir, cuando una interacción entre el virus y la célula hospedante está a punto de ocurrir.

Ejemplo 6: Efecto del pretratamiento de células eucariotas por el iota carragenano en la inhibición de la muerte de la célula mediada por HRV8

- 35 Células subconfluentes HeLa fueron infectadas con el rinovirus humano tipo 8 (HRV8; moi = 0,1) en presencia de iota-carragenano en concentraciones de 4, 40 y 400 µg/ml (véase la figura 6A). En comparación, células HeLa subconfluentes se incubaron durante tres horas con iota-carragenano en una concentración de 4, 40 y 400 µg/ml antes de la infección. El sobrenadante que contenía iota carragenano se retiró y las células se lavaron tres veces con PBS y después se infectaron con HRV8 en ausencia del polímero (ver la figura 6b). El porcentaje de células viables en relación con el control no infectado se determinó para cada concentración de iota carragenano.

- 40 Como se muestra en la Figura 6A, el iota-carragenano inhibe la muerte celular mediada por HRV8 en todas las concentraciones. De la figura 6B se puede tomar que, al contrario que con los virus que entran en la célula a través

- 45

de receptores de azúcar, la muerte celular mediada por HRV8 no se inhibió en más de un 5%, incluso a 400 µg/ml y en donde las células se preincubaron durante tres horas con iota -carragenano. Este resultado es consistente con los resultados anteriores (datos no mostrados) y sugiere que para HRV8 la preincubación de las células diana con carragenano no protege significativamente las células diana de que se conviertan en infectadas si el carragenano falta en el momento de la infección. Este resultado indica que el receptor para HRV8, el receptor LDL, no se modifica o enmascara por el tratamiento con el iota-carragenano.

Ejemplo 7: El iota carragenano es cuantitativamente eliminado de las células HeLa por lavado de las células con PBS

Las células HeLa se incubaron con el iota carragenano marcado con FITC en una concentración de 400, 133, 4 y 0,4 µg/ml durante 10 minutos, a continuación, se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron tres veces con PBS. La cantidad de carragenano marcado con FITC residual se determinó con un lector de detección fluorescente (BMG-Omega) después de eliminar el sobrenadante que contenía el iota carragenano marcado con FITC y después de cada etapa de lavado. Las unidades de luz fluorescentes fueron convertidas en valores de concentración en µg/ml de carragenano usando una curva estándar.

Como se muestra en la Figura 7, el iota carragenano marcado con FITC se eliminó cuantitativamente (> 95%) de las células HeLa por lavado de las células por lo menos tres veces con PBS. Este resultado demuestra que el carragenano no se une covalentemente a la superficie de las células. El resultado fue confirmado por un segundo grupo experimental, donde se extendió el período de incubación de 10 minutos a 3 horas utilizando el mismo método de detección. Los resultados por lo tanto soportan las conclusiones extraídas en la presente memoria y en los ejemplos donde el carragenano induce una modificación de los receptores de azúcar sobre la superficie de la célula diana implicados en la unión de los viriones, cuya modificación todavía está presente después de la eliminación del polímero de la superficie de la célula diana.

Ejemplo 8: Efecto del pretratamiento de células eucariotas por iota carragenano en la inhibición de la muerte celular mediada por VSR

Células Vero subconfluentes se infectaron en presencia de iota carragenano a concentraciones de 0,4, 4 y 40 µg/ml con VSR (moi = 0,1). En comparación, células Vero subconfluentes se incubaron durante tres horas con iota carragenano en una concentración de 0,4, 4 y 40 µg/ml. El sobrenadante que contenía el iota carragenano se retiró y las células se lavaron tres veces con PBS y se infectaron con VSR (moi = 0,1) en ausencia del carragenano. El porcentaje de células viables en relación con el control no infectado se determinó para cada concentración de carragenano.

Como se muestra en la Figura 8, el iota-carragenano inhibe la muerte celular mediada por VSR en todas las concentraciones, incluso si el polímero está ausente en el momento de y durante la infección. Se sabe que VSR se une a las células a través de sulfato de heparán, una molécula de azúcar que está presente en la superficie de las células epiteliales. Los resultados indican que este receptor es modificado por el iota carragenano y la unión de VSR a la superficie celular y la replicación viral posterior están de esta forma bloqueadas.

Ejemplo 9: Efecto del tratamiento de la célula eucariota con iota carragenano a diferentes tiempos después de la infección en la inhibición de la muerte celular mediada por VSR en células HNep

Células subconfluentes HNep fueron infectados con VSR (moi = 0,1). Se añadió iota carragenano a una concentración final de 40 µg/ml después de la infección en diferentes puntos de tiempo, como se indica en la figura 9 (0, 8, 24, 32, 48, 56 y 72 horas después de la infección) y el porcentaje de células HNep viables con respecto a las de control no infectadas se determinó para cada punto de tiempo.

Como se muestra en la Figura 9, el iota carragenano inhibió significativamente la muerte celular mediada por VSR a una concentración de 100 µg/ml incluso cuando el polímero se añadió sólo 24 horas después de la infección. Este resultado demuestra que el iota carragenano puede no sólo utilizarse de forma profiláctica sino que también puede ejercer una eficacia antiviral en el curso de un tratamiento terapéutico cuando se aplica en la fase temprana de la infección viral.

Ejemplo 10: Efecto del tratamiento profiláctico con iota carragenano en la inhibición de la muerte celular mediada por VSR en células HNep

Células subconfluentes HNep, se infectaron en presencia de iota-carragenano a una concentración de 400, 133, 44, 15, 5, 2 y 1 µg/ml con VSR (moi = 0,1). El porcentaje de células viables HNep con respecto al control no infectado se determinó para cada concentración de iota carragenano.

Como se muestra en la Figura 10, el iota carragenano inhibió significativamente la muerte celular mediada por VSR incluso a una concentración tan baja como 1 µg/ml cuando el polímero estuvo presente durante la infección. Este

resultado demuestra que el iota carragenano se puede utilizar eficazmente para las estrategias de intervención profiláctica.

Ejemplo 11: Efecto del tratamiento de células eucariotas por carragenanos diferentes en la inhibición de la muerte celular mediada por VSR en células HEp-2

- 5 Células HEp-2 en placas de 6 pocillos fueron infectadas en presencia de iota, kappa o lambda carragenano a una concentración de 0,01, 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml con virus VSR A2 (moi = 0,001). El porcentaje de células viables en relación con las de control no infectadas se determinó para cada carragenano y concentración.

Como se muestra en la Figura 11, los tres tipos de carragenano inhiben la muerte celular mediada por VSR en células HEp-2, con el iota-carragenano mostrando el efecto más fuerte.

- 10 Ejemplo 12: Comparación del efecto del tratamiento de células eucariotas con iota carragenano y fucoidán en la inhibición de la muerte celular mediada por VSR

Células HNep subconfluentes se infectaron en presencia de iota carragenano y fucoidán a una concentración de 400, 133, 44, 15, 4, 1,3 y 0,4 con VSR (moi = 0,1). El porcentaje de células viables HNep con respecto a las de control no infectadas se determinó para cada concentración de iota carragenano y cada concentración de fucoidán.

- 15 Como se muestra en la Figura 12, el fucoidán inhibe significativamente la muerte celular mediada por VSR en células HNep a una concentración de 0,4 µg/ml cuando el polímero está presente durante la infección. El fucoidán es por lo tanto un candidato interesante para el desarrollo de productos para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones por VSR.

- 20 Ejemplo 13: Efecto del tratamiento de células eucariotas con carragenanos diferentes y fucoidán en la inhibición de la muerte celular mediada por el virus de la parainfluenza 3

Células HNep subconfluentes se infectaron en presencia de cualquiera de iota, kappa, lambda carragenano o fucoidán a una concentración de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 y 0,4 µg/ml con el virus de la parainfluenza 3. El porcentaje de células HNep viables (por lo tanto no infectadas) con relación al control de las no infectadas se determinó para cada polímero y cada concentración de polímero.

- 25 Como se muestra en la Figura 13, los tres tipos de carragenano inhiben la muerte celular en células HNep mediada por el virus de la parainfluenza 3, con iota carragenano mostrando el efecto más fuerte. Fucoidán también inhibe la muerte celular mediada por el virus de la parainfluenza 3 en células HNep en un grado comparable con el efecto inhibidor del kappa y lambda carragenano.

- 30 Ejemplo 14: Efecto del tratamiento de células eucariotas con diferentes carragenanos y fucoidán en la inhibición de la muerte celular mediada por el virus de la influenza H3N2

Células subconfluentes HNep se infectaron en presencia de iota, kappa, lambda carragenano y fucoidán a una concentración de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 y 0,4 µg/ml con virus de la influenza H3N2. El porcentaje de células viables HNep con relación al de las del control no infectado se determinó para cada polímero y cada concentración de polímero.

- 35 Como se muestra en la Figura 14, los tres tipos de carragenano inhiben la muerte celular mediada por el virus de la influenza H3N2 en células HNep. Además, se encontró que el fucoidán inhibe la muerte celular mediada por el virus de la influenza H3N2 en células HNep en un grado comparable al del iota carragenano.

Ejemplo 15: Efecto de diferentes carragenanos y fucoidán sobre la formación de placas de virus de la influenza aviar H5N1 en células MDCK

- 40 Suspensiones de virus que contenían 60-80 pfu de virus de la influenza aviar H5N1 se mezclaron con una solución madre de polímero de cualquiera de iota, kappa, lambda carragenano o fucoidan para concentraciones finales de polímero de 400 o 44,4 µg/ml. Monocapas confluentes de la línea celular de riñón canino MDCK en placas de seis pocillos fueron infectadas con las suspensiones de virus durante 60 minutos a 34° C. Los inóculos de infección se retiraron y las células se lavaron con PBS y se añadió la capa sobrenadante de agarosa que contenía 0,6% de agarosa. Las placas se incubaron a 36° C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ en el aire. 48-60 horas después de la infección la capa de agarosa sobrenadante se eliminó, las células se tiñeron con cristal violeta y las placas visibles se contaron. El porcentaje de formación de las placas en relación con el de las células control infectadas (sin tratamiento polímero) se determinó para cada polímero y cada concentración de polímero.

- 50 Como se muestra en la Figura 15, se encontró que la formación de placas de virus de la influenza aviar H5N1 no fue influenciada por el iota y lambda carragenano y fucoidán. Sin embargo, el kappa carragenano inhibe, de una manera

dependiente de la dosis, la formación de placas de virus de la influenza aviar H5N1 en células MDCK. Ya que el virus de la influenza aviar se une preferentemente a los residuos de ácido siálico con enlace alfa 2-3 los resultados indican que el kappa carragenano preferiblemente puede modificar dichos residuos de ácido siálico con enlace 2-3.

5 Ejemplo 16: Efecto del tratamiento profiláctico de células eucariotas con el iota carragenano en la inhibición de la muerte celular mediada por el adenovirus de tipo B (Ad50)

Células HNep subconfluentes se infectaron en presencia de iota-carragenano en una concentración de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 y 0,4 µg/ml con AD50. El porcentaje de células viables HNep con relación al de las de control no infectadas se determinó para cada concentración de iota carragenano.

10 Como se muestra en la Figura 16, el iota-carragenano inhibe significativamente la muerte celular mediada por Ad50 incluso a una concentración tan baja como 4 µg/ml cuando el polímero está presente en el momento de y durante la infección. Este resultado es una indicación de que el iota carragenano se puede usar para la eficacia de las estrategias de intervención profiláctica contra el adenovirus del subtipo B (por ejemplo AD50). Sin embargo, cuando otros adenovirus de los subtipos A, C y D se probaron en un trabajo experimental como se ha descrito anteriormente no se detectó ningún efecto significativo del iota carragenano (datos no mostrados).

15 Ejemplo 17: Comparación del efecto del tratamiento profiláctico de células eucariotas con iota carragenano en la inhibición de la muerte celular mediada por Ad50

20 Se infectaron células subconfluentes HNep en presencia de iota carragenano en una concentración de 400, 40 y 4 µg/ml con Ad50. En comparación, las células subconfluentes HNep se incubaron durante tres horas con iota carragenano en una concentración de 400, 40 y 4 µg/ml antes de la infección. El sobrenadante que contenía iota carragenano se retiró y las células se lavaron tres veces con PBS y se infectaron con Ad50 en ausencia del carragenano. El porcentaje de células HNep viables con relación al control de las no infectadas se determinó para cada concentración de iota carragenano.

25 Como se muestra en la Figura 17, el iota-carragenano inhibe significativamente la muerte celular mediada por Ad50 a una concentración de 400 y 40 µg/ml en presencia y en ausencia del iota carragenano en el momento de la infección y durante el periodo de infección observado. Estos datos indican que el iota carragenano modifica el receptor de superficie celular para adenovirus de subtipo B, que es conocido por ser un receptor de azúcar, mientras que los adenovirus de otros subtipos probablemente entran en la célula a través de diferentes receptores.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Iota-carragenano en una cantidad antiviral eficaz para su uso como un ingrediente activo antiviral en una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una condición, síntoma o enfermedad causado por o relacionado con una infección por un virus respiratorio seleccionado del grupo constituido por paramixovirus, virus A de la influenza humana, y adenovirus de subtipo B.
- 2.** Iota carragenano para uso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho paramixovirus se selecciona de entre el grupo que consiste en el virus de la parainfluenza humana (VPH) tipo 1, VPH tipo 2, VPH tipo 3, VPH tipo 4 y VSR.
- 10 **3.** Iota carragenano para uso según se reivindica en la reivindicación 1 o 2, en donde dicho estado patológico o enfermedad se selecciona del grupo que consiste en la bronquitis aguda, bronquitis crónica, rinitis, sinusitis, tosferina, bronquiolitis aguda, faringitis, amigdalitis, laringitis, traqueítis, asma y neumonía, y en donde dicho síntoma se selecciona del grupo que consiste en la fiebre, dolor, mareos, temblores, sudoración y deshidratación.
- 15 **4.** Iota carragenano para uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición farmacéutica antiviral o medicamento está adaptado para uso tópico de la piel o la mucosa y se prepara preferiblemente en forma de loción de la piel, crema, ungüento, gel, polvo, incluyendo un polvo para inhalación, aerosol, espuma, gotas de líquido, o una solución para gárgaras.
- 20 **5.** Iota carragenano para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición farmacéutica antiviral o medicamento se adapta para administración oral y se prepara preferiblemente como una solución líquida, o como una preparación semisólida o sólida tal como un polvo seco, comprimidos, cápsulas, o grageas.
- 6.** Iota carragenano para uso como se reivindica en la reivindicación 4 o 5, en donde la composición es líquida o semisólida y comprende, como una preparación lista para su uso, iota-carragenano en una cantidad de entre 0,01% y 10%, preferiblemente entre 0,01% y 5%, más preferiblemente entre 0,1% y 2% en peso, con relación al volumen total de la preparación.
- 25 **7.** Iota carragenano para uso como se reivindica en la reivindicación 5, en donde la composición es sólida y comprende, como una preparación lista para su uso, iota-carragenano en una cantidad de entre 0,01% y 10%, preferiblemente entre 0,01% y 5%, preferiblemente entre 0,1% y 2% en peso.
- 30 **8.** Iota carragenano para uso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la composición comprende además kapa carragenano, en donde la composición comprende 50% o más, preferiblemente 70% o más, y especialmente 95% o más en peso seco de iota carragenano, en relación al peso seco total de carragenanos presentes en la composición.
- 35 **9.** Iota carragenano para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha composición comprende además al menos un vehículo y/o aditivo farmacéuticamente aceptables, dicho aditivo farmacéuticamente aceptable preferiblemente se selecciona de cloruro de sodio y cloruro de potasio y está presente en la composición en una cantidad de 1% o menos, preferiblemente de 0,6% o menos.
- 10.** Iota carragenano para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición comprende una parte o la totalidad de iota carragenano en forma de su sal, preferiblemente por medio de una sal de sodio.
- 40 **11.** Iota carragenano para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la composición está unida por recubrimiento o impregnación a una superficie sólida de un artículo de higiene o sanitario, en particular un guante higiénico o sanitario, tejido o papel, especialmente un tejido o papel nasal, un bastoncillo de algodón, máscara de polvo o una mascarilla facial sanitaria o médica.
- 12.** Iota carragenano para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la composición está integrada en una barra de labios.
- 45 **13.** Iota carragenano para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición comprende además un compuesto que no es un carragenano fisiológicamente activo, dicho compuesto está opcionalmente como el principal ingrediente activo.
- 50 **14.** Iota carragenano para uso según se reivindica en la reivindicación 13, en donde el iota-carragenano está presente como un adyuvante eficaz antiviral paramixoviral o antiviral de la influenza humana A junto con una o más sustancias que no son un carragenano fisiológicamente activas que se aplican típicamente en la profilaxis o terapia

de enfermedades infecciosas y/o inflamatorias, alergias y/o condiciones de un sistema inmune deteriorado o suprimido.

- 5 **15.** Iota carragenano para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el síntoma patológico, afección o enfermedad está en un individuo que es un paciente de alto riesgo seleccionado del grupo que consiste en un paciente con EPOC, un paciente con asma, una persona con alergias, una persona con deterioro inmunológico, cardíaco, o pulmonar, y un paciente de trasplante.

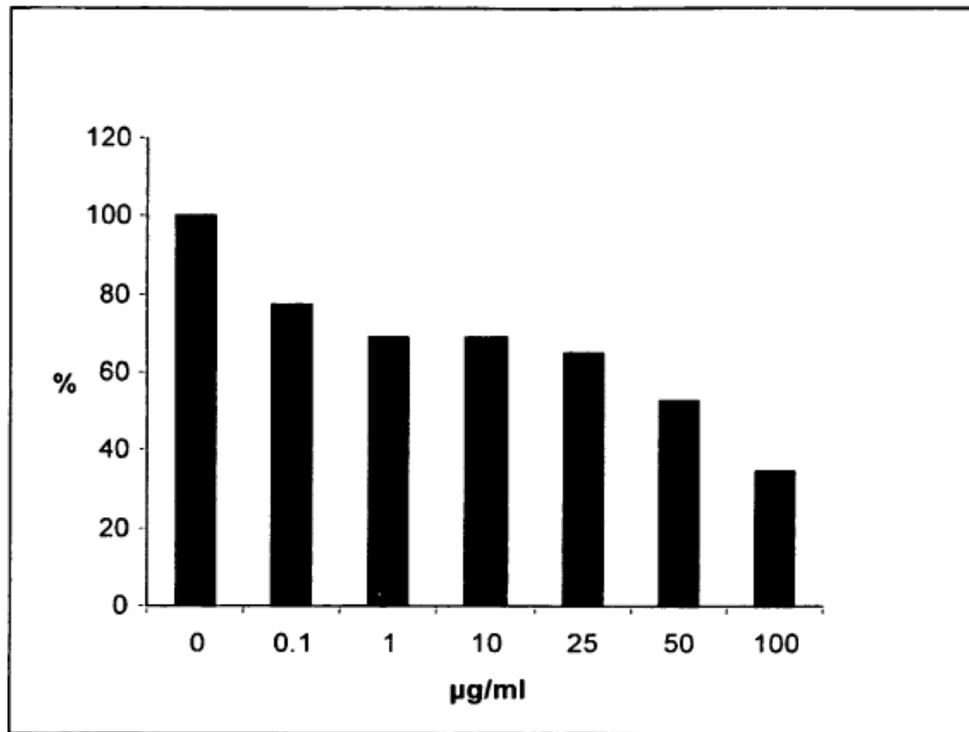


Fig. 1

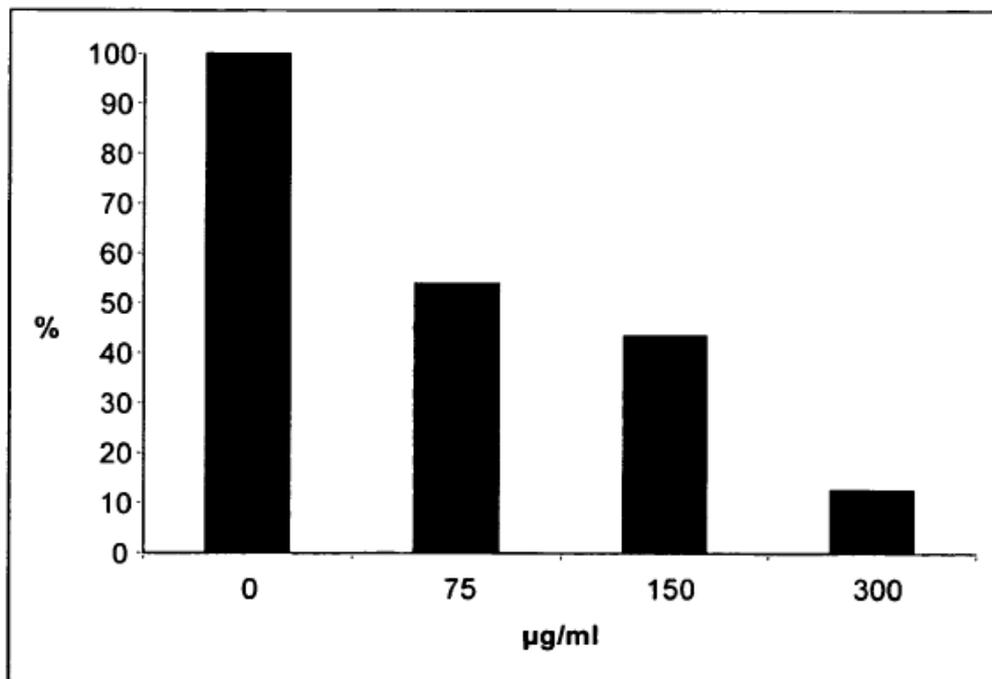


Fig. 2

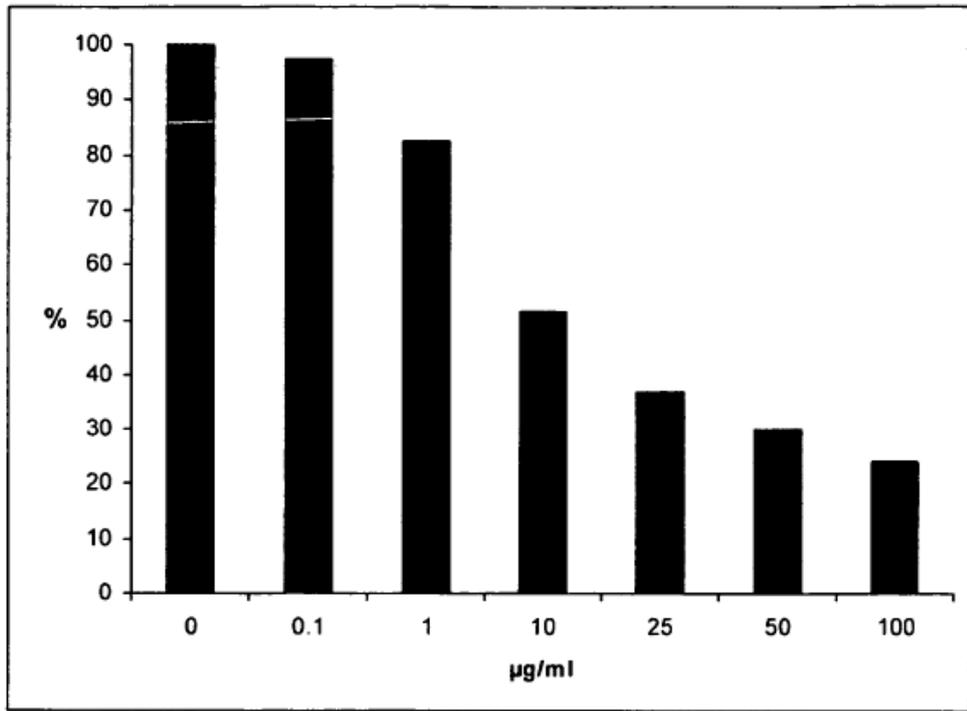


Fig.3

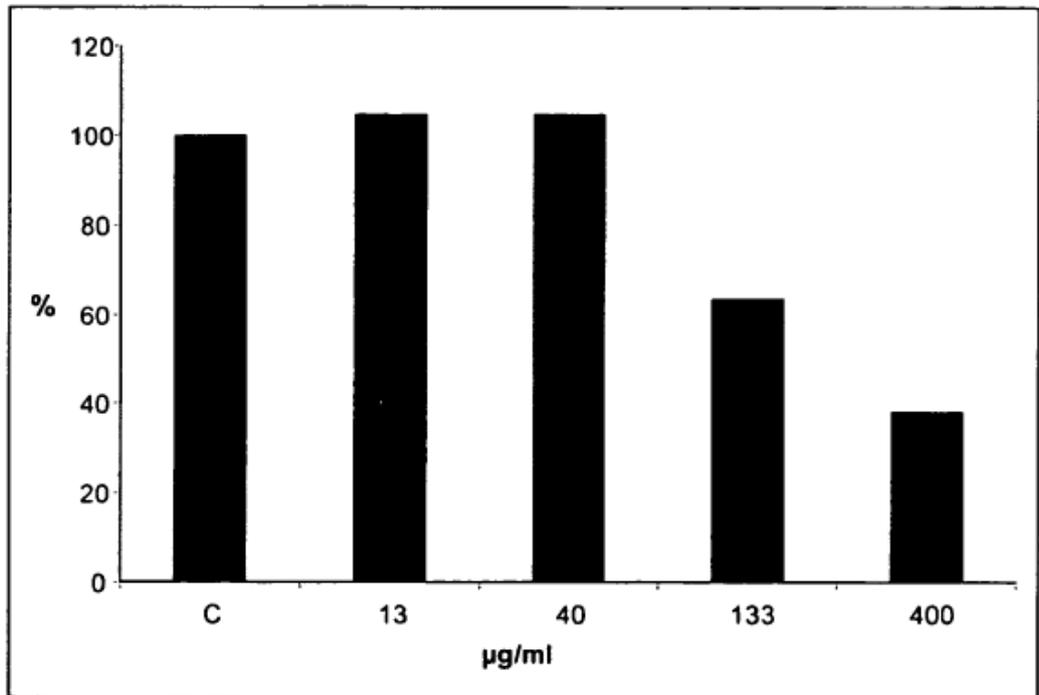


Fig.4

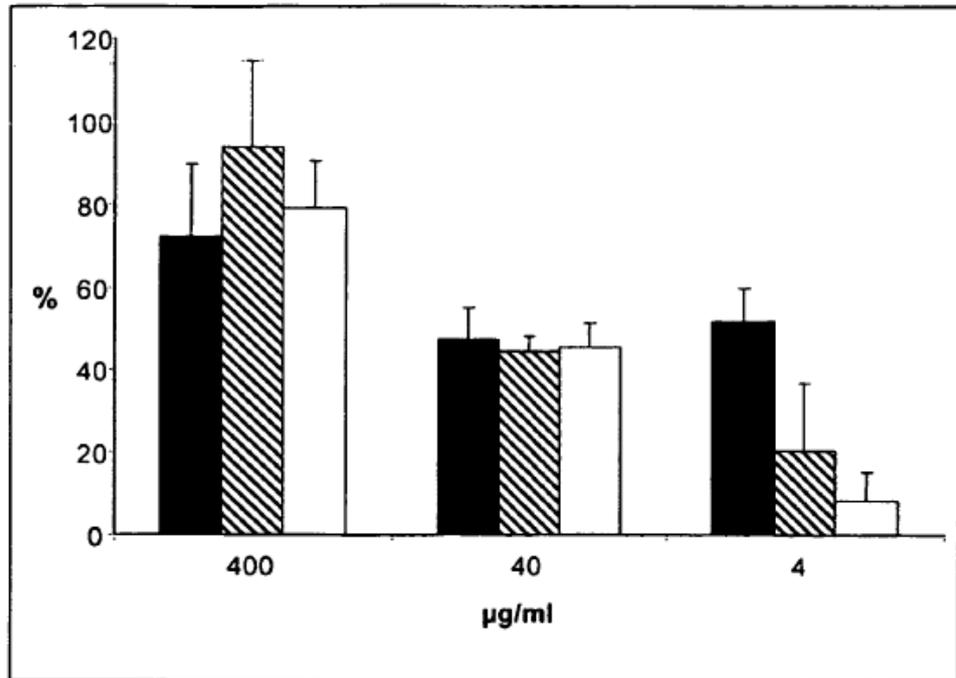


Fig.5A

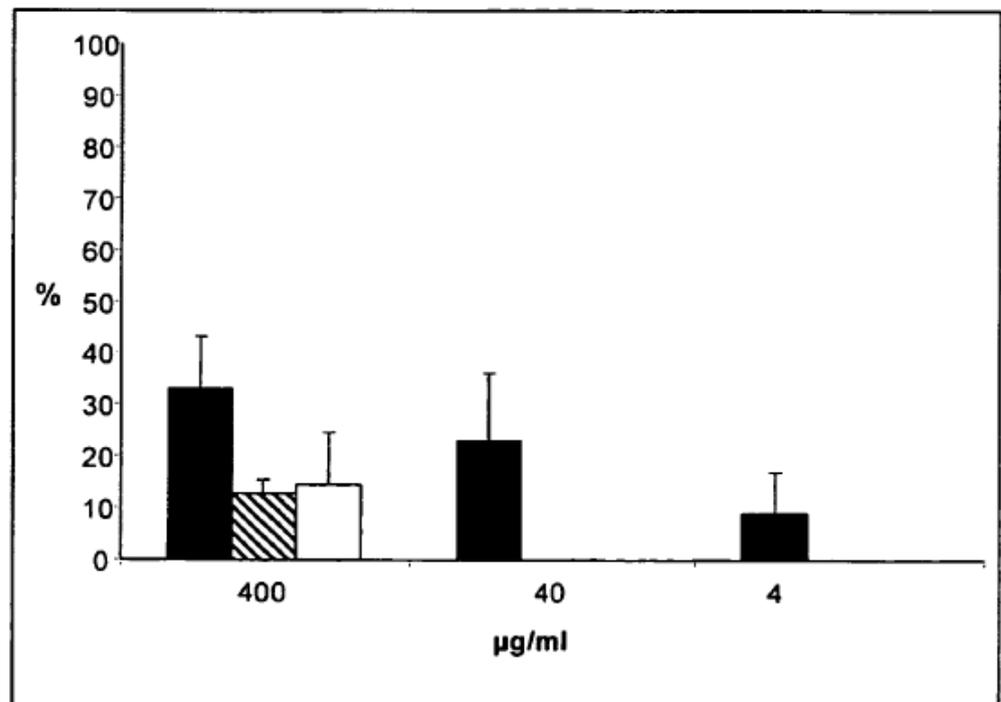


Fig.5B

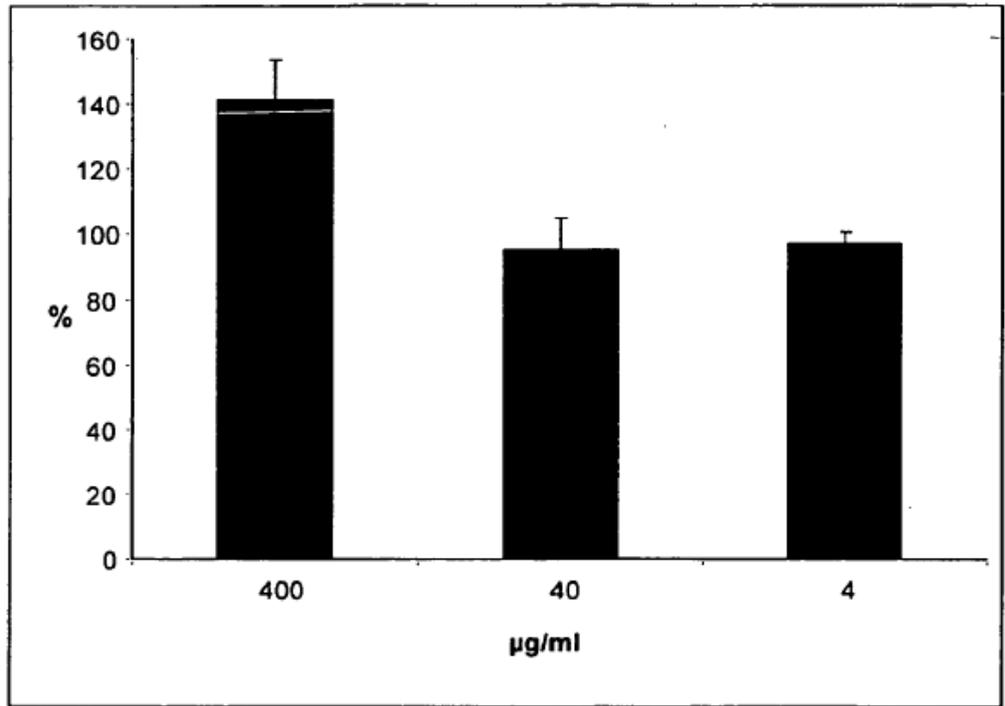


Fig.6A

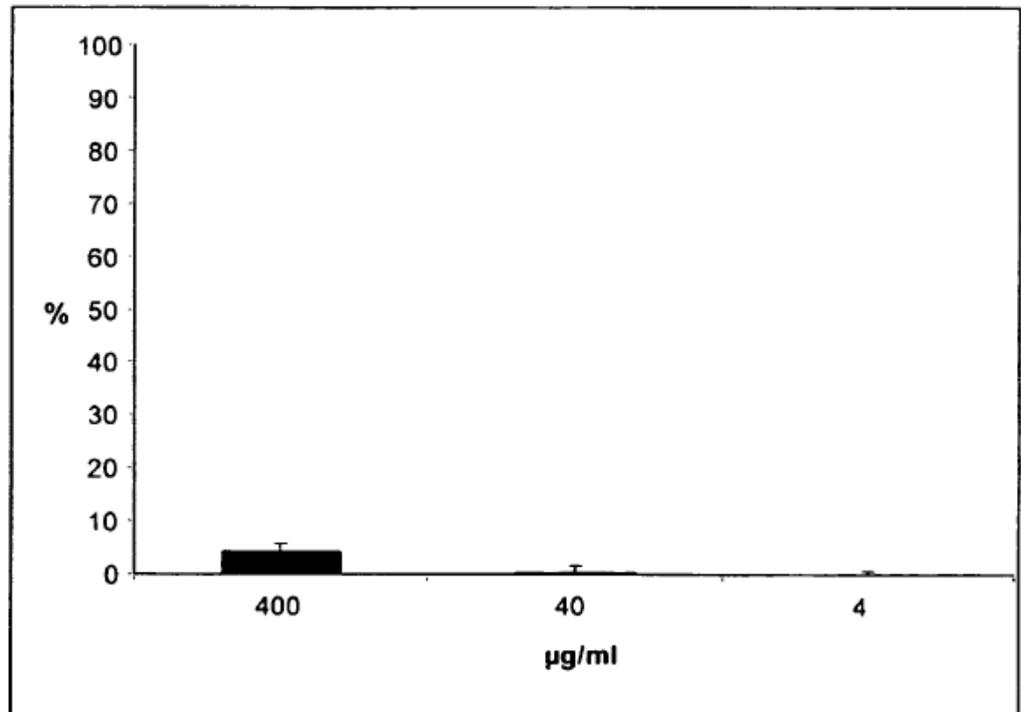


Fig.6B

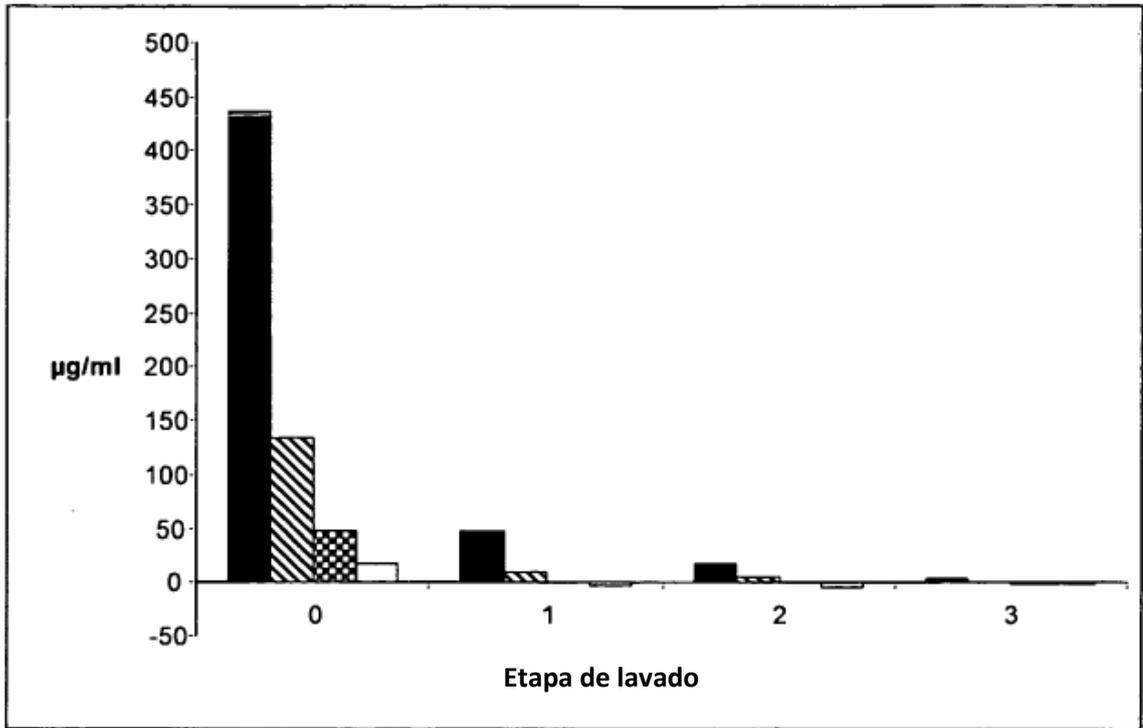


Fig.7

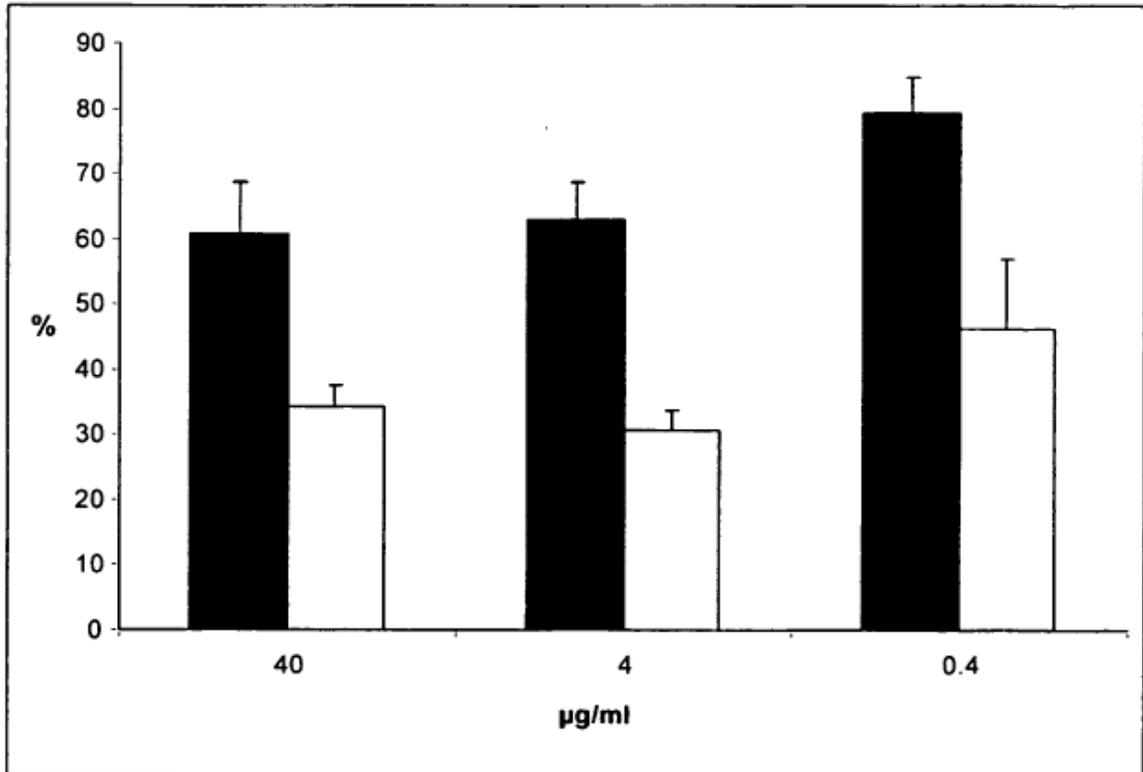


Fig.8

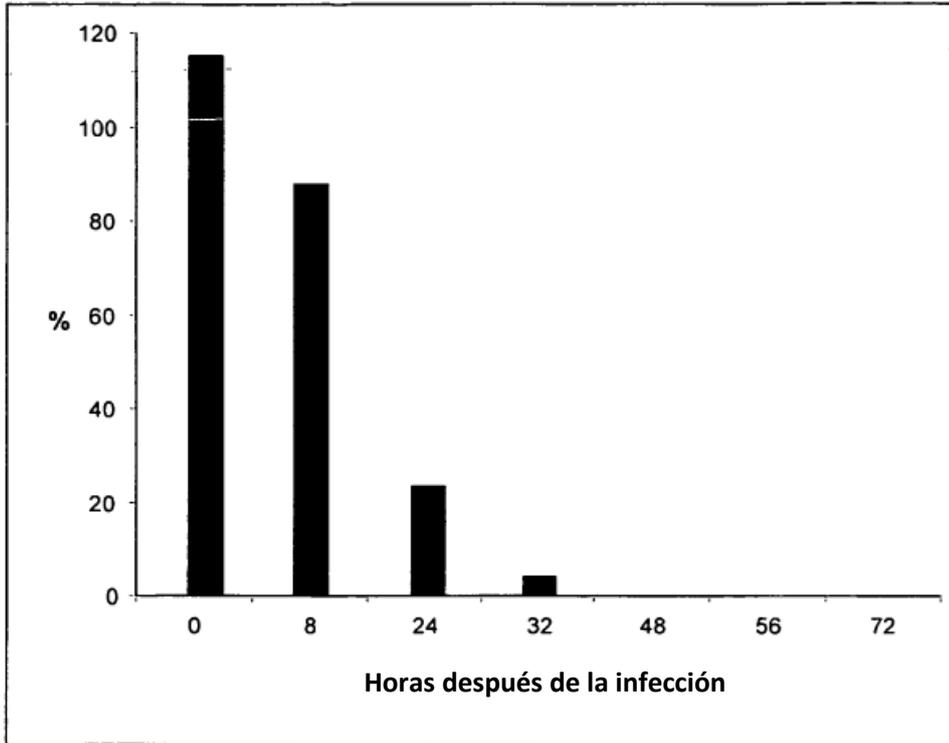


Fig.9

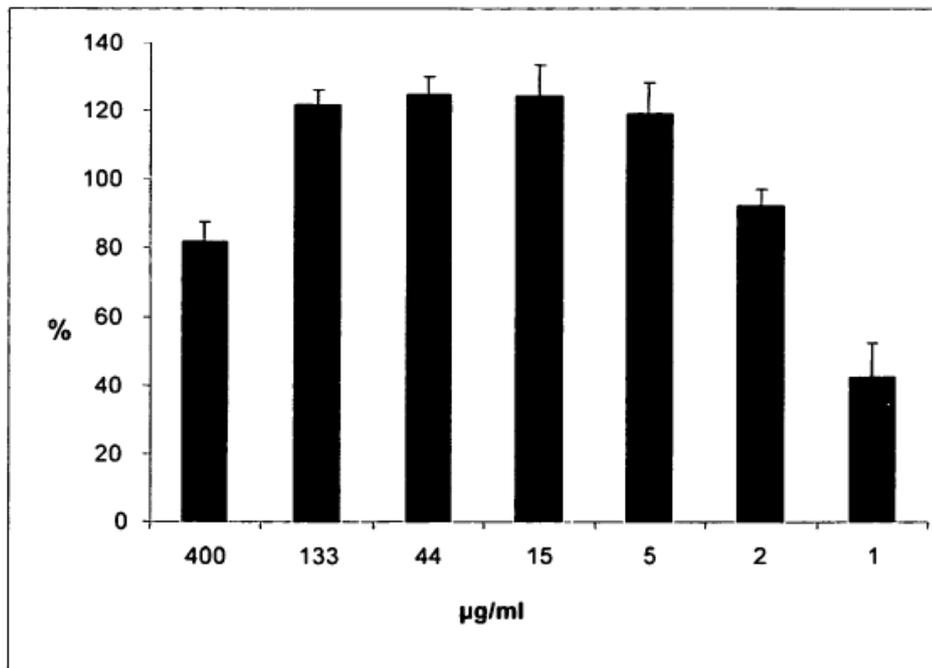


Fig.10

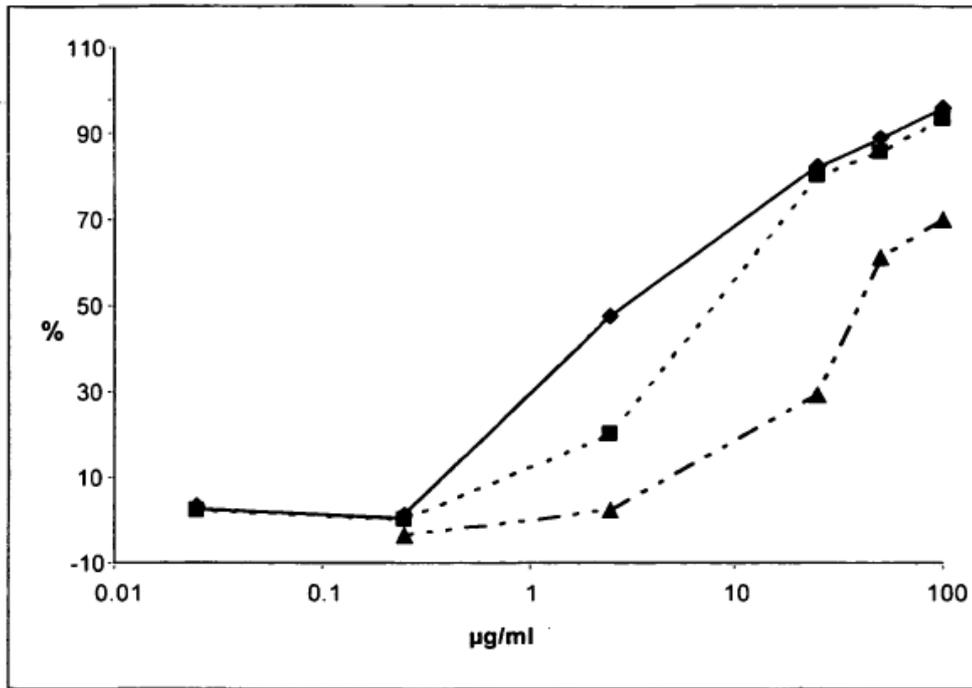


Fig.11

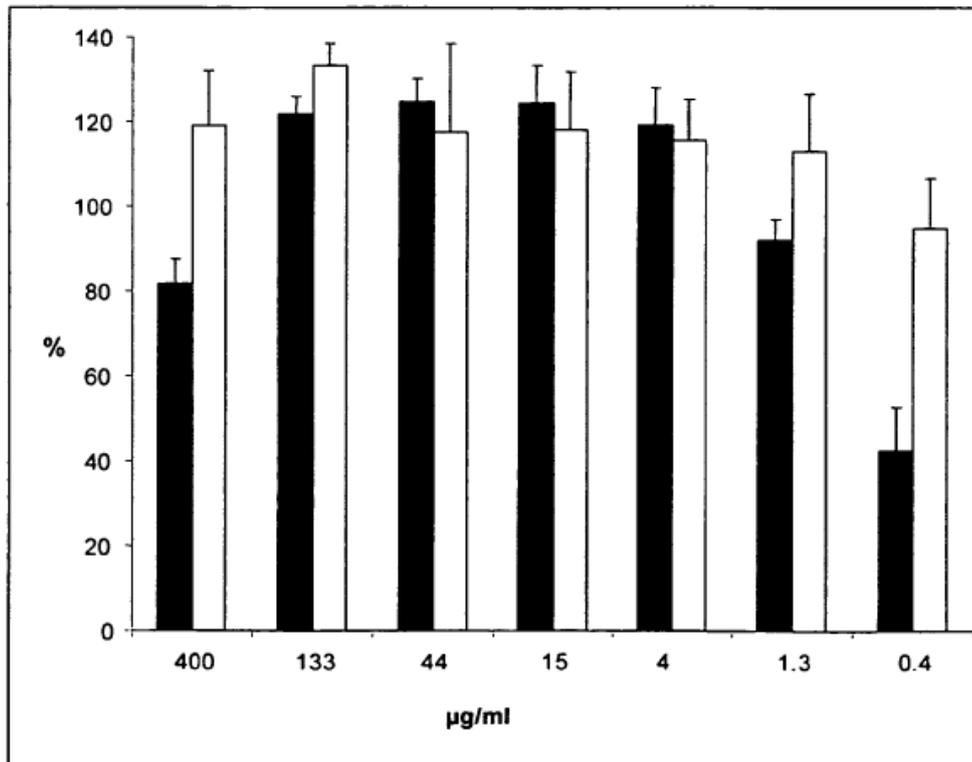


Fig.12

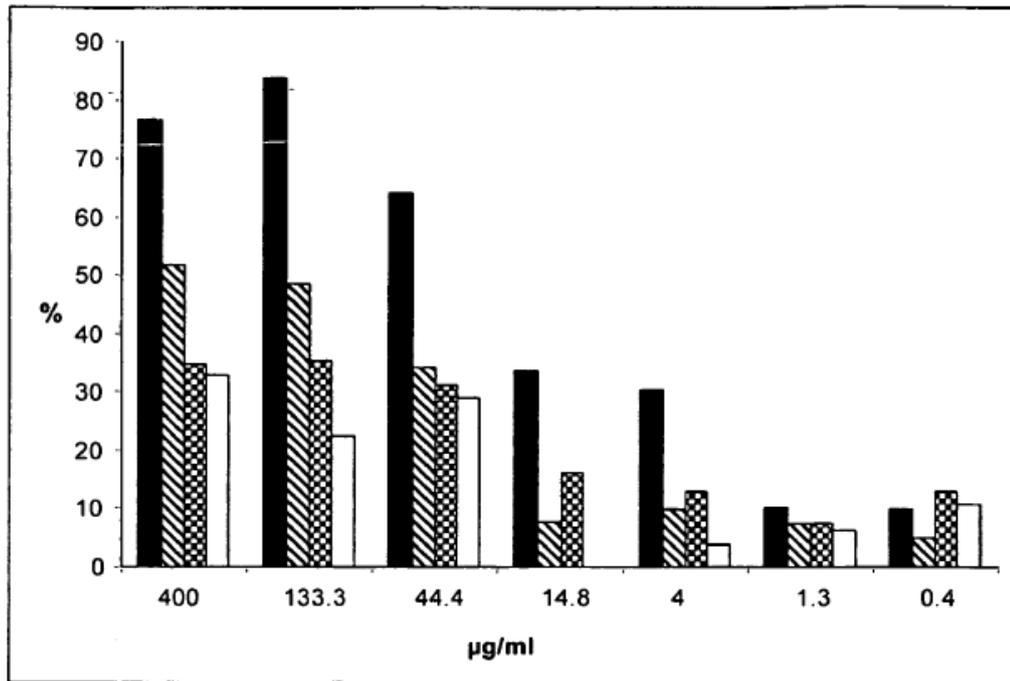


Fig. 13

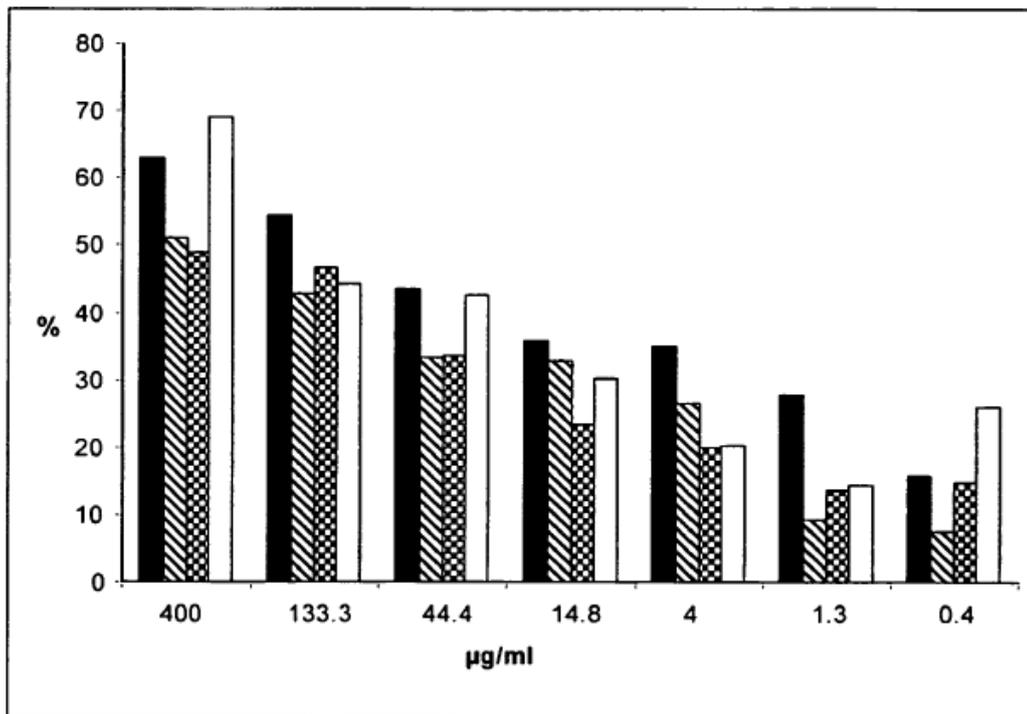


Fig. 14

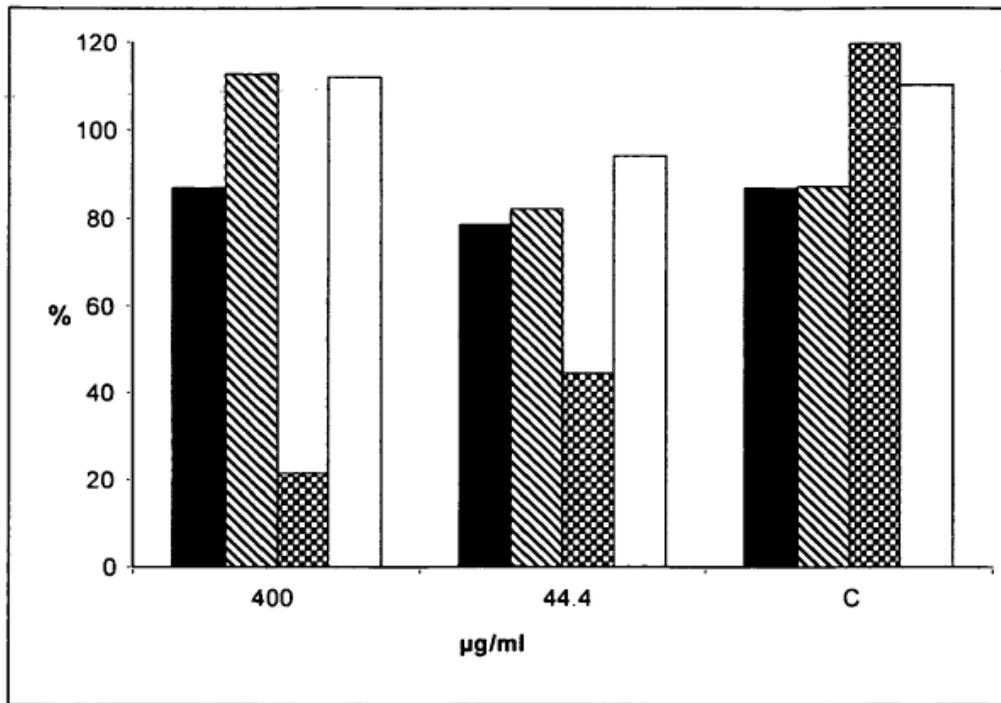


Fig.15

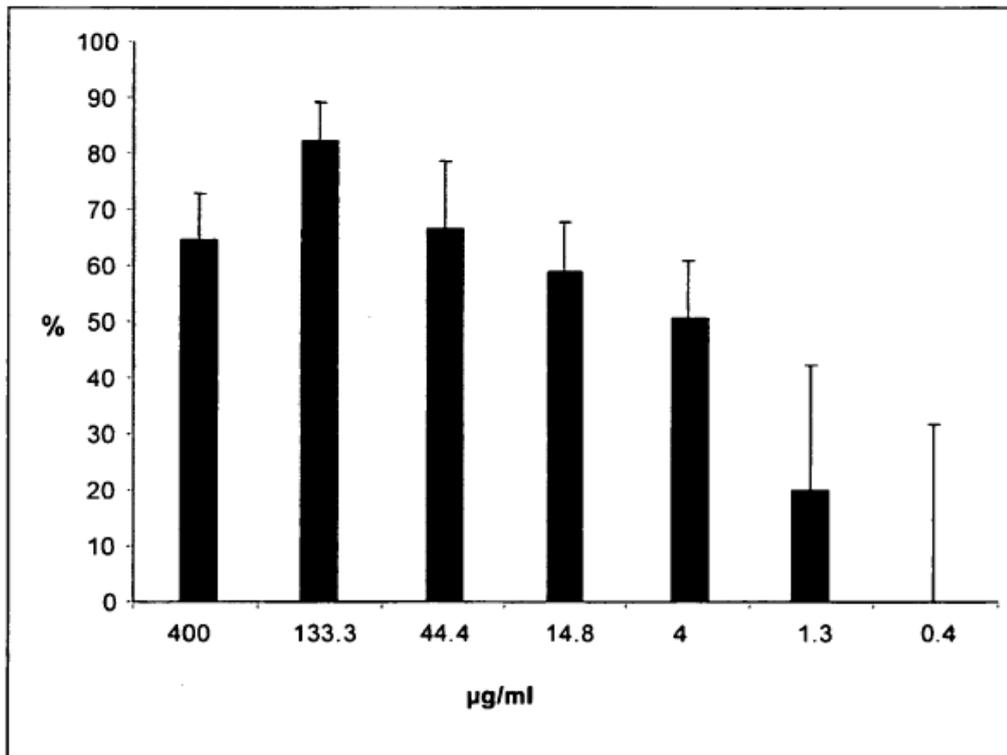


Fig.16

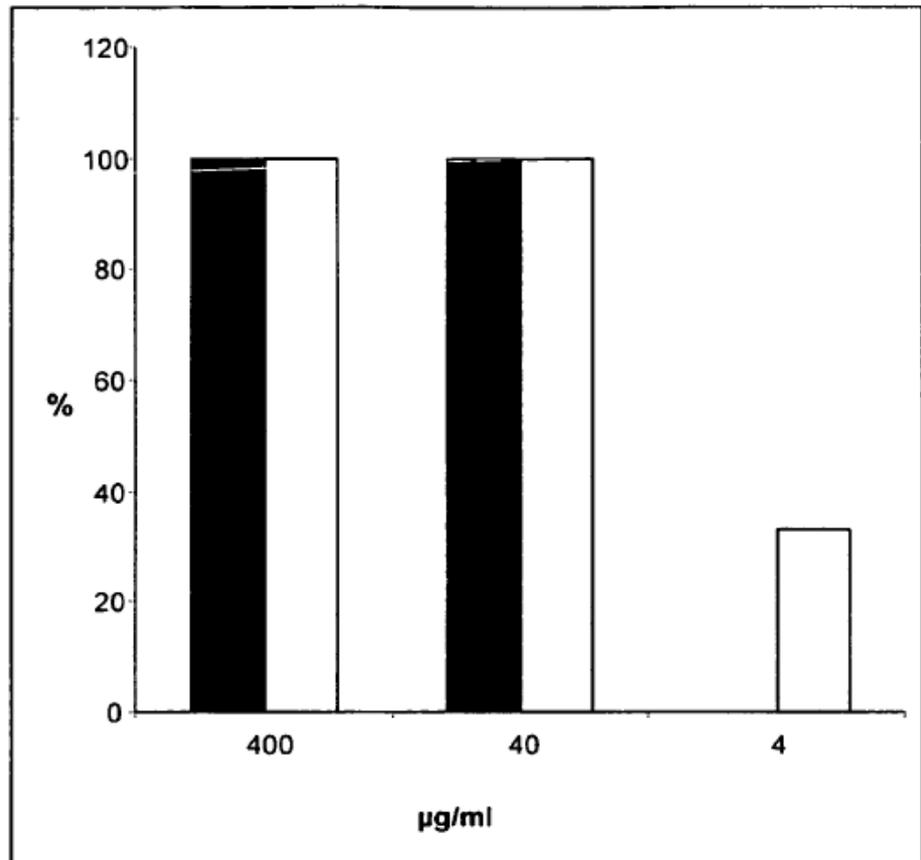


Fig.17