

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 758**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2011 E 11785277 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2640410**

54 Título: **Composición que comprende un péptido y un inhibidor de la neuraminidasa vírica**

30 Prioridad:

18.11.2010 AT 19082010

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

30.12.2014

73 Titular/es:

**APEPTICO FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG
GMBH (100.0%)
Mariahilferstrasse 136
1150 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**FISCHER, BERNHARD;
LUCAS, RUDOLF y
FISCHER, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 525 758 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 que comprende un péptido y un inhibidor de la neuraminidasa vírica

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la gripe.

5 En el caso de seres humanos la gripe es una enfermedad de las vías respiratorias y de la totalidad del organismo causada por virus de la gripe. Los virus de la gripe pertenecen a la familia de los ortomixovirus, que está caracterizada por un genoma de ARN segmentado en orientación de cadena negativa. Los representantes relevantes para seres humanos son los virus de la gripe A y de la gripe B, siendo conocido particularmente el subtipo A como patógeno de enfermedades de las vías respiratorias muy febriles. Además de su importancia veterinaria, todos los virus de la gripe poseen un potencial zoonótico, es decir, es posible una transferencia de gallinas o cerdos a seres humanos.

10 La gripe aparece periódicamente como pandemia, originándose la mayor parte de las veces en Asia sudoriental y China y expandiéndose desde allí por todo el mundo. Las pandemias de virus de la gripe están asociadas con un número elevado de fallecimientos, no solo en ancianos, sino también en jóvenes. Según la OMS, la gripe estacional anual provoca aproximadamente de 3 a 5 millones de casos de enfermedad grave, con una tasa de fallecimientos de 250.000 a 500.000. La causa de fallecimiento más habitual es la neumonía por gripe con insuficiencia pulmonar como consecuencia, pero se presentan también lesiones cardiovasculares tales como miocarditis (inflamación del miocardio) o pericarditis (inflamación del pericardio). También se consideran una inflamación del encéfalo y/o de las meninges (meningoencefalitis) o la lesión de otros sistemas de órganos (particularmente riñones) como causas de fallecimiento más habituales.

20 El tiempo de incubación es normalmente de 4-5 días, pero también más corto. La enfermedad comienza con la aparición súbita de dolor de cabeza, sensación de frío, escalofríos y tos. Les sigue una fiebre alta de hasta 41 °C, dolor muscular, pérdida de apetito y sensación de debilidad general. Esta fase dura aproximadamente 3 días, después la fiebre disminuye y a partir del sexto día, la mayor parte de las veces, se reduce a unos valores normales, el virus se elimina del organismo. La tos puede perdurar varias semanas.

25 Una gripe grave con riesgo para la vida aparece cuando se desarrolla en asociación con los síntomas descritos una inflamación pulmonar intersticial vírica primaria (a menudo hemorrágica). Aparece, además de en personas debilitadas, también en aproximadamente el 25 % de personas sanas o sin lesiones previas y puede durar hasta 2 semanas. Una inflamación pulmonar de este tipo puede demostrarse mediante el aumento del peso pulmonar.

30 Las inflamaciones pulmonares pueden estar causadas también de forma secundaria por una sobreinfección bacteriana (entre otras bacterias, por *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*). Los factores que favorecen estas complicaciones son, entre otros, otras enfermedades pulmonares (por ejemplo, asma), inmunodeficiencia, la edad (niños pequeños y ancianos), diabetes, lesiones pulmonares, fumar. Las personas con estas complicaciones son, por lo tanto, el grupo objetivo prioritario para la vacunación.

35 Los virus de la gripe alcanzan el organismo mediante infección por gotitas e infectan mediante la unión de la proteína HAP a restos de ácido neuramínico terminales de las células epiteliales de la mucosa de la boca, la nariz y de la faringe. Desde aquí se propagan al aparato respiratorio inferior. Se pueden observar destrucciones celulares en los epitelios ciliados y las capas dérmicas productoras de mucosidad de todas las regiones del aparato respiratorio. Si se desarrolla una inflamación intersticial primaria, el virus se transfiere a las células del parénquima pulmonar. Se encuentran inflamaciones fuertes de las paredes alveolares, cuyo epitelio a menudo está completamente destrozado debido a la destrucción de células. Una inflamación del tejido pulmonar de este tipo puede demostrarse mediante el aumento del peso pulmonar.

40 Existen tratamientos tanto preventivos como también terapéuticos. De este modo existen a disposición vacunas contra infecciones por gripe A y por gripe B. Estas son, a este respecto, virus muertos que se han cultivado en huevos de gallina y/o cultivo celular. La inmunización logra en aproximadamente dos semanas después de la vacuna su actividad completa. No obstante, debido a la alta variabilidad de los virus de la gripe, las vacunas deben adaptarse anualmente a los subtipos o variantes de subtipos de virus que se encuentren actualmente en circulación.

45 Además, se usan los inhibidores de la neuraminidasa vírica (zanamivir, oseltamivir) que impiden la solubilidad de partículas víricas replicadas nuevas desde la célula huésped. Preferentemente se usan poco después de una infección realizada y comprobada por virus de la gripe, para limitar la propagación de virus en la fase temprana de la infección (documento WO 2003/026567 A2).

50 Los inhibidores de la neuraminidasa vírica intervienen solo, sin embargo, en la proliferación de virus, pero no pueden inactivar los virus que se encuentran ya en el organismo. Los inhibidores de la neuraminidasa pueden contribuir solo acortando la duración de la enfermedad mínimamente (en promedio, en adultos, en un día).

55 El objetivo de la presente invención es aumentar claramente el efecto terapéutico de inhibidores de este tipo de la replicación vírica. Con la presente invención se pondrán a disposición composiciones farmacéuticas mejoradas para el tratamiento de infecciones por virus de la gripe.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una composición que comprende

- un péptido, que está constituido por 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TX¹EX²X³E, en el que X¹, X² y X³ pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, no presentando el péptido ninguna actividad de unión al receptor de TNF y estando ciclado, y

5 - un inhibidor de la neuraminidasa vírica, particularmente para su uso para la prevención y el tratamiento de la gripe.

Se ha establecido según la invención que el efecto de inhibidores de la neuraminidasa puede mejorarse, sorprendentemente, cuando se usa un péptido, tal como se ha definido anteriormente, en combinación con un inhibidor de la neuraminidasa para el tratamiento de infecciones de gripe. También se indica con ello el uso profiláctico de la composición según la invención. Se ha demostrado que la presente invención es particularmente eficaz en el tratamiento de inflamaciones pulmonares causadas por virus de la gripe.

Los péptidos que se usan según la invención son conocidos, por ejemplo, por la patente europea EP 1 264 599 B1 (o por los documentos US 2007/299003 A, WO 94/18325 A1 o WO 2008/148545 A1) y se han usado en el estado de la técnica para el tratamiento de acumulaciones de líquidos (edemas pulmonares) y particularmente para la reabsorción de estas acumulaciones de líquidos. Sin embargo, estos péptidos son adecuados también, sorprendentemente para influir en la corriente de líquido que se dirige en dirección opuesta a través del endotelio de los capilares hacia el interior del epitelio del pulmón y, por lo tanto, también pueden usarse para prevenir y tratar la hiperpermeabilidad de células epiteliales y células endoteliales (documento WO 2010/099556 A).

Estos péptidos, conocidos de por sí, que se usan según la invención conjuntamente con el inhibidor de la neuraminidasa no presentan ninguna actividad de unión al receptor de TNF (Hribar y col., Eur. J. Immunol. 1999; Elia y col., AJRCCM 2003; véase también: la sección de ejemplos, más adelante) y están ciclados. Variantes preferentes de estos péptidos están constituidas por 7-17 aminoácidos adyacentes y contienen el hexámero TPEGAE (SEC ID N° 4).

Mientras que, no obstante, el documento WO 2010/099556 A1, así como también el documento EP 1 264 599 A1, se refieren al tratamiento de determinados síntomas patológicos en el pulmón y no a la prevención y el tratamiento de una enfermedad causada por un determinado patógeno, el uso según la presente invención es completamente distinto:

Tal como se ha comprobado en el transcurso del trabajo para la presente invención, los péptidos según lo reivindicado (entre otros, según el documento WO 2010/099556 A1) favorecen el efecto de los inhibidores de la neuraminidasa de un modo sinérgico en el preparado de combinación según la invención. El uso según la presente invención se refiere directamente, por lo tanto, a la infección por virus de la gripe y no a los síntomas generales que pueden desencadenarse por varios patógenos distintos (tal como es el caso, por ejemplo, en el documento WO 2010/099556 A1 o en el documento EP 1 264 599 A1).

Esta claro a los ojos de un experto en este campo que los inhibidores de la neuraminidasa solo pueden inhibir la proliferación del virus de la gripe, pero no pueden reducir, sin embargo, los virus ya vivos; esto es totalmente sorprendente y no se ha sugerido por el estado de la técnica que la combinación de inhibidores de la neuraminidasa y los péptidos según lo reivindicado tiene como consecuencia una mejora esencial en la lucha contra la gripe. En el estado de la técnica el experto no obtiene ninguna sugerencia para esta combinación, por el contrario:

En el documento WO 2003/026567 A2 se describe que los inhibidores de la neuraminidasa usados para el tratamiento de la gripe son también adecuados para evitar infecciones bacterianas asociadas a la gripe. Partiendo de este documento un experto no puede reconocer, por lo tanto, absolutamente ninguna razón para añadir otros aditivos a los inhibidores de la neuraminidasa que mejoren la actividad antivírica o la eficacia de un tratamiento contra la gripe.

En una forma de realización particularmente preferente de la presente invención la composición según la invención comprende un péptido cíclico constituido por una secuencia de aminoácidos secuenciales seleccionada del grupo constituido por

- QRETPEGAEAKPWY (SEC ID N° 5)
- PKDTPEGAEALKPWY (SEC ID N° 6)
- CGQRETPEGAEAKPWYC (SEC ID N° 1) y
- CGPKDTPEGAEALKPWYC (SEC ID N° 7)

y fragmentos de al menos 7 aminoácidos de las mismas, fragmentos que presentan el hexámero TPEGAE.

Preferentemente, el péptido en la composición comprende la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC (SEC ID N° 1) y está ciclado a través de los restos de C. Este péptido particularmente preferente tiene, por lo tanto,

la secuencia de aminoácidos siguiente (SEC ID N° 1) (NH₂)Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Cys(COOH). Este péptido se denomina también "AP301".

5 La ciclación de los péptidos según la invención puede lograrse, a este respecto, mediante una ciclación directa a través de un puente disulfuro entre los dos restos de C de los extremos N y C terminales o, si no, acoplado el péptido a través de ambas cisteínas a una sustancia portadora. A este respecto, en los péptidos según la invención los restos de cisteína se encuentran preferentemente al comienzo y al final de la molécula. También pueden usarse otros grupos funcionales con los que se obtenga una ciclación del péptido, por ejemplo haciendo que un grupo ácido con una amina o alcohol proporcione un cierre de anillo de amida o de éster (a este respecto pueden ciclarse, preferentemente intramolecularmente, por ejemplo, los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico con serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina o lisina). La ciclación del péptido se realiza preferentemente mediante un puente disulfuro entre los restos de C del péptido (cuando están presentes).

Por lo tanto, otros péptidos preferentes según la invención son, por ejemplo, CGQKETPEGAEAKPWYC (SEC ID N° 8), CGQRETPEGAEARPWYC (SEC ID N° 9), CGQRETPEGAEAKPC (SEC ID N° 10), CQRETPEGAEAKPWYC (SEC ID N° 11) o CGQRETPEGAEAKFWYC (SEC ID N° 12).

15 La ciclación también puede realizarse, sin embargo, mediante unión del péptido a una sustancia portadora. Como sustancias portadoras de ciclación se consideran todas las sustancias habituales que pueden usarse farmacéuticamente que sean capaces de entrar en un enlace covalente con los grupos SH de la cisteína (o con otros grupos químicamente reactivos presentes de forma natural o introducidos artificialmente del péptido), siendo particularmente adecuadas proteínas portadoras habituales, tales como hemocianina de lapa californiana (KLH), toxina del tétanos, etc. También pueden estar previstos restos bifuncionales adyacentes en el material portador (por ejemplo grupos ácidos además de grupos amina o alcohol). En este contexto es importante que con la "ciclación" esté comprendido tanto un cierre de anillo intramolecular como también la integración de un material portador (del que se distingue el péptido unido (estando unido el extremo N terminal y el extremo C terminal del péptido al material portador)), mostrando el péptido ciclado de este modo la estructura espacial cíclica y estando estabilizado correspondientemente.

Los inhibidores de la neuraminidasa vírica son conocidos y se ha demostrado ya que son eficaces en la prevención y el tratamiento de la gripe. Los inhibidores de la neuraminidasa vírica de este tipo (tales como, por ejemplo zanamivir, oseltamivir, laninamivir o peramivir) impiden el desprendimiento de nuevas partículas de virus replicadas desde la célula huésped. Sobre todo poco después de una infección realizada y comprobada causada por virus de la gripe puede limitarse, con ello, la proliferación de virus en la fase temprana de la infección.

Estos inhibidores de la neuraminidasa intervienen solo, sin embargo, en la proliferación de virus, pero no pueden inactivar virus que se encuentran ya en el organismo, que modo que a menudo solo pueden reducir mínimamente la duración de la enfermedad (en promedio, en adultos, en un día). Pero sobre todo no pueden combatirse o evitarse con los mismos de una forma suficientemente eficaz, generalmente, los síntomas de la gripe, particularmente una inflamación de pulmones, que la mayor parte de las veces tiene como consecuencia complicaciones particulares.

La neuraminidasa es una enzima esencial para la reproducción del virus de la gripe y se ha descrito como "tijera molecular" responsable de la liberación de virus.

Los inhibidores de neuroaminidasa comprenden análogos de ácido siálico que representan una nueva clase de la segunda generación de agentes antivíricos que muestran actividad frente a los virus de la gripe A y B. Los inhibidores de la neuraminidasa según la presente invención pueden ser todos los compuestos propuestos para ello hasta la fecha, tal como se resume, por ejemplo, en el documento US 2008/0063722 A1 (también para formulaciones farmacéuticas preferentes de sustancias de este tipo). Estas sustancias pueden inhibir al menos una actividad enzimática de la proteína neuraminidasa de una cepa virulenta de un virión de la gripe del tipo A o del tipo B. Las sustancias de este tipo pueden usarse tanto para la prevención como también para el tratamiento de la gripe; en combinación con los péptidos definidos anteriormente según la presente invención este efecto, sin embargo, se mejora significativamente.

Ejemplos de inhibidores de neuramidasa que pueden usarse en la presente composición se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 5.453.533, 5.763.483, 5.952.375, 5.958.973, 5.512.596, 5.886.213, 5.602.277, 6.410.594, 5.360.817, 5.866.601, 6.340.702, 6.451.766, 6.455.571, 6.593.314, 6.509.359, 6.518.305 y 6.831.096. Son sustancias que ya se usan en seres humanos (o al menos están en pruebas clínicas) y, por lo tanto, son particularmente preferentes, por ejemplo CS-8958 (RI 18958; documento US 2008/0063722 A1), zanamivir (GG167, RELEN-ZA[®]), peramivir (RWJ-270201, BCX-1812), oseltamivir-fosfato (Ro64-0796, GS4104), oseltamivir-carboxilato (Ro64-0802, GS4071) u oseltamivir (GS4104, TAMIFLU[®]). Naturalmente, los inhibidores de la neuraminidasa según la invención están comprendidos en todas las formas químicas activas, es decir, como sales, formas racémicas, ópticamente puras y/o no salinas (también en forma de, por ejemplo, el enantiómero o diastereómero).

Preferentemente, el inhibidor de la neuraminidasa vírica es zanamivir u oseltamivir; estas sustancias son preferentes, debido a que ya se usan de una forma particularmente exitosa para el tratamiento de seres humanos.

De un modo preferente, la composición según la invención comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y está preparada como composición farmacéutica adecuada para la administración a seres humanos.

La expresión "una composición farmacéutica" se refiere a cada composición que comprende un inhibidor de la neuraminidasa y un péptido, tal como se han definido anteriormente, (naturalmente también mezclas adecuadas (es decir, que no interfieren negativamente entre sí) de sustancias de este tipo, que previenen, mejoran o curan las afecciones descritas en el presente documento. En particular, la expresión "una composición farmacéutica" se refiere a una composición que presenta un inhibidor de la neuraminidasa y un péptido, tal como se han descrito anteriormente, y un vehículo o excipiente (ambos términos pueden usarse de forma intercambiable) farmacéuticamente aceptable. Ejemplos adecuados de vehículos o excipientes que son conocidos por el experto son agua, solución de sal común, fosfato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, arginina, TRIS y citrato de sodio o mezclas de los mismos. Naturalmente, también pueden usarse solución de Ringer, solución de dextrosa o soluciones de azúcar no reducible, de forma correspondiente son también adecuados manitol, trehalosa, sacarosa, sorbitol, fructosa, maltosa, lactosa o dextrano, solución de Hank, aceites fijados, oleato de etilo, dextrosa al 5 % en solución de sal común, sustancias que mejoran la isotonía y la estabilidad química, tampones y conservantes como vehículos de este tipo. Otros vehículos adecuados incluyen todos los vehículos que no inducen por sí mismos la producción de anticuerpos que son perjudiciales para el individuo al que se suministra la composición, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. En la formulación de la composición según la invención se tienen en cuenta, naturalmente, las directrices propuestas (por ejemplo, la farmacopea (europea o de Estados Unidos)). A este respecto, el péptido previsto en la composición según la invención también se cicla mediante enlace covalente directo a este vehículo.

La composición farmacéutica según la invención puede administrarse (como medicamento) mediante cualquiera de los procedimientos adecuados conocidos por el experto, en particular es preferente administrar el péptido que se usa según la invención o la composición según la invención en el pulmón. Aunque la gripe también desempeña un cierto papel en animales y la composición según la invención, naturalmente, también se puede usar para prevención y profilaxis en animales, se concede prioridad en la presente invención a la prevención y el tratamiento en seres humanos, es decir, personas que se han infectado ya con la gripe o corren el riesgo de infectarse con este virus (particularmente en epidemias o pandemias de gripe). La vía de administración preferente es la inhalación (mediante aerosol), pero también la administración intravenosa, instilación, administración oral o combinaciones de las mismas. En caso de una administración por inhalación, por vía parenteral o por vía oral, el medicamento de la presente invención se formula en forma de unidades de dosificación tales como solución, suspensión o emulsión, en asociación con los excipientes farmacéuticamente aceptables definidos anteriormente. Naturalmente, la dosificación y el tipo de administración pueden depender también, no obstante, del caso individual del individuo correspondiente.

A este respecto, se administra la cantidad activa necesaria en cada caso en el individuo que necesita la administración. A este respecto, la "cantidad activa" se entiende como una cantidad que es lo suficientemente activa para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado, es decir, por ejemplo, impedir una propagación adicional de la enfermedad o tratarla de forma activa. A este respecto, la mayor parte de las veces se parte de pacientes promedio, pero pueden formularse las cantidades eficaces reales de los componentes en la composición de modo que se tengan en cuenta el modo de administración y la edad, peso, estado del paciente y grado y progreso de la enfermedad (por ejemplo, por medio de un protocolo farmacológico adecuado habitual).

Por lo tanto, preferentemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable en la composición según la invención se selecciona entre agua (de modo particularmente preferente: agua para inyectables, sal común, fosfato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, arginina, TRIS, citrato de sodio, solución de Ringer, dextrosa, manitol, trehalosa, sacarosa, sorbitol, fructosa, maltosa, lactosa o dextrano, solución de Hank, aceite fijado, oleato de etilo, sustancias que mejoran la isotonía y la estabilidad química, conservantes, proteínas farmacéuticamente aceptables, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos.

También puede proporcionarse la composición según la invención de forma que estén presentes los dos componentes activos, es decir el inhibidor de la neuraminidasa y el péptido, tal como se han descrito anteriormente, en forma separada espacialmente, es decir como un kit, que comprende al menos un inhibidor de la neuraminidasa y un péptido (en cada caso en recipientes separados entre sí). Por lo tanto, la presente invención se refiere también a un kit que comprende al menos un inhibidor de la neuraminidasa y un péptido (en cada caso en recipientes separados entre sí). La administración separada que se posibilita de este modo (espacial, pero también temporalmente) de péptido y del inhibidor es sobre todo preferente cuando se desean vías de administración diferentes para ambos componentes activos según la invención en los pacientes en cuestión. Por ejemplo, se administra oseltamivir la mayor parte de las veces por vía oral, pero el péptido que se usa según la invención se administra por inhalación. Sin embargo, a menudo también es deseable una administración simultánea, por ejemplo el zanamivir se administra también por inhalación. Naturalmente, también puede indicarse que un inhibidor de uso oral se pone a disposición sistémicamente por medio de inhalación. En algunos casos el péptido que se va a usar según la invención se mezcla conjuntamente con el inhibidor de neuraminidasa solo con dificultad, por ejemplo cuando el inhibidor se administra por vía i.v. u oral y el péptido por inhalación. En muchos casos, no obstante, se pueden administrar el inhibidor y el péptido conjuntamente por inhalación, alcanzando el inhibidor entonces

directamente el pulmón y, dado el caso, a través de este, la sangre (los virus de la gripe están presentes principalmente en el tejido pulmonar).

5 En un kit de este tipo según la invención, que comprende los componentes de neuraminidasa y de péptido separados, pueden preverse naturalmente también las características y las formas de realización descritas en el presente documento para la composición en todas las combinaciones concebibles por el experto.

El medicamento según la invención puede administrarse, por ejemplo, suministrando el péptido de la presente invención en una dosis de entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, más preferentemente entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, del modo más preferente entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferentemente se suministra como dosis de bolo. No obstante, también puede usarse una inhalación o infusión continua o una administración mediante tomas repetidas.

10 Las composiciones particularmente preferentes según la invención contienen, independientemente entre sí,
 - el péptido en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 10 µg a 1 g, particularmente de 1 mg a 100 mg, y
 - el inhibidor de la neuraminidasa vírica en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 100 µg a 1 g, particularmente de 1 mg a 200 mg.

15 Las composiciones particularmente preferentes según la invención en forma líquida contienen, independientemente entre sí,
 - el péptido en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 10 µg a 1 g, particularmente de 1 mg a 100 mg, y
 - el inhibidor de la neuraminidasa vírica en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 100 µg a 1 g, particularmente de 1 mg a 200 mg,
 y están presentes en un volumen de 0,5 a 10 ml, particularmente en un volumen de 1 a 5 ml.

20 La composición según la invención puede administrarse preferentemente también en forma seca por medio de un inhalador de polvo. Ejemplos de inhaladores de polvo que se pueden usar para la presente invención se describen en las patentes de Estados Unidos N° 4.995.385 y 4.069.819; productos ya establecidos son SPINHALER®, ROTHALER®, FLOWCAPS®, INHALATOR®, DISKHALER® y AEROLIZER®.

25 La composición según la invención puede administrarse preferentemente también como aerosol por medio de un nebulizador de líquidos. Ejemplos de nebulizadores de líquidos de este tipo son productos establecidos tales como Aeroneb® y Pari®.

Según una forma de realización preferente, la composición según la invención está caracterizada porque el péptido y/o el inhibidor de la neuraminidasa vírica están presentes en una formulación en polvo nebulizable o en una formulación líquida nebulizable.

30 La composición según la invención se usa preferentemente para el tratamiento y la prevención de infecciones por el virus de la gripe tipo A y tipo B, particularmente el tipo A. No obstante, la composición es también adecuada, en principio, para prevenir o tratar infecciones por todas las cepas posibles del virus de la gripe que pueden provocar estar enfermedad en un animal o en un ser humano. Los bancos de datos correspondientes con informaciones de los distintos tipos de gripe tienen la confianza de los expertos en este campo, particularmente están descritas o
 35 incluso secuenciadas muchas cepas aisladas del tipo A.

La invención se explicará con más detalle mediante los ejemplos y las figuras ilustrativas siguientes, a los que no obstante no está, por supuesto, limitada.

Muestran:

40 Figura 1: el peso pulmonar relativo de ratones C57BL/6 los días 3, 5, 7 y 9 después de infección con gripe A o (como control) sin infección;

Figura 2: el peso pulmonar relativo de ratones C57BL/6 los días 5, 7 y 9 después de infección con gripe A y tratamiento con oseltamivir, tratamiento con la composición según la invención y sin tratamiento (con PBS; como control);

45 Figura 3: el peso pulmonar relativo de ratones C57BL/6 los días 7 y 9 después de infección con gripe A y tratamiento con zanamivir, tratamiento con la composición según la invención y sin tratamiento (con PBS; como control);

Ejemplos

50 Con los presentes ejemplos se muestra en un modelo de ratón experimental reconocido que se ha logrado el objetivo según la invención administrando a ratones infectados con virus de la gripe tanto un inhibidor de la neuraminidasa como también una combinación de inhibidor de la neuraminidasa y del péptido sintético AP301 (SEC. ID. N° 1).

Ejemplo 1

La infección con virus de la gripe provoca la aparición de una inflamación pulmonar.

5 Se infectaron ratones de laboratorio (cepa C57BL/6, 8 semanas de edad) por vía nasal con la cepa del virus de la gripe A (PR8/34) y una dosificación de 150 UFP. Los días 3, 5, 7 y 9 después de la infección se extrajeron los pulmones, en cada caso, de ocho ratones y se determinó el peso pulmonar relativo como medida de la inflamación pulmonar.

El experimento determinó que con el aumento de la duración de la infección de los ratones con el virus de la gripe el peso pulmonar aumentó significativamente en comparación con los controles. Los resultados se representan gráficamente en la figura 1.

10 **Ejemplo 2**

Tratamiento de la inflamación pulmonar mediante administración de inhibidor de la neuraminidasa o administración de una combinación de inhibidor de la neuraminidasa y péptido AP301.

15 Se infectaron ratones de laboratorio (cepa C57BL/6, 8 semanas de edad) por vía nasal con la cepa del virus de la gripe A (PR8/34) y una dosificación de 150 UFP. A continuación recibieron los animales de ensayo en cada caso administraciones por vía oral de 10 mg/kg de oseltamivir (inhibidor de la neuraminidasa) y administraciones por vía intratraqueal de 10 µg/animal de ensayo de péptido AP301. El tratamiento se repitió los días 2º y 4º del ensayo.

Los días 5, 7 y 9 después de la infección se extrajeron los pulmones, en cada caso, de 30 ratones y se determinó el peso pulmonar relativo como medida de la inflamación pulmonar. Los resultados se representan gráficamente en la figura 2.

20 El experimento determinó que el inhibidor de la neuraminidasa ejerce un efecto solo moderado en la reducción de la inflamación pulmonar, medida mediante el peso pulmonar. No obstante, en los ratones infectados con el virus de la gripe a los que se administró además del inhibidor de la neuraminidasa el péptido AP301 se pudo reducir de forma esencialmente significativa la inflamación pulmonar.

Ejemplo 3

25 Valoración ex vivo de propiedades proinflamatorias del péptido AP301 en sangre completa humana.

30 Se llevó a cabo un estudio de seguridad ex vivo farmacológico con respecto al péptido AP301 en sangre completa humana para determinar si el péptido AP301 provoca la liberación del marcador proinflamatorio interleucina 6 (IL-6) a partir de sangre completa reciente (es decir, si el APN 301 muestra o no actividad específica de TFN (es decir, actividad de unión al receptor de TFN)). En este estudio se ha usado sangre completa reciente, tratándose a este respecto de un modelo de previsión reconocido para la valoración de la reacción de inflamación in vivo.

Resumen de la metodología

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de señalización proinflamatoria del péptido AP301. A este respecto se usaron cultivos de sangre completa y la secreción de interleucina-6 (IL-6), un marcador muy sensible para la estimulación proinflamatoria, mediante cuantificación con ELISA.

35 Sistema de ensayo

Sistema de ensayo Se usaron en los ensayos 25 ml de sangre heparinizada recogida recientemente de 5 voluntarios sanos (VS).

Producto de ensayo

Identificación: Péptido AP301 (Dosis: 1 ng/ml a 10 µg/ml; una administración única en solución)

40 Descripción Polvo blanco, pureza del 96 %

Cultivos de sangre completa

Los cultivos de sangre completa (SC) se realizaron pipeteando 1 ml de SC en cavidades de placas de 24 pocillos. En cada experimento se incluyeron cultivos de control no estimulados y estimulados.

45 Cuando era posible se usaron las sustancias de ensayo y los estimulantes siempre en el mismo volumen en cada pocillo en un experimento dado, que no era superior al 10 % del volumen total del pocillo. Los controles no estimulados se realizaron con PBS. El ajuste del volumen y las diluciones para los distintos tratamientos se llevaron a cabo también con PBS.

Se mezcló el contenido de cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C y el 5 % de CO₂ durante 24 horas. Después de la incubación se transfirió el contenido de cada pocillo a un microtubo de 1,5 ml nuevo y se centrifugó a 8000 a 9000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante de cada muestra se repartió de forma individual en dos recipientes de reacción de 1,5 ml y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5 Detección de interleucina-6

La interleucina-6 se cuantificó mediante un ELISA específico (kit de ELISA de IL-6 humana, BD Biosciences, N° de cat. 555220) usando un anticuerpo anti-IL-6 humana como anticuerpo captador, un anticuerpo de detección anti-IL-6 humana biotinilado, un conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante como reactivo de enzima e IL-6 recombinante como patrón. La medición de la absorción a 450 nm se llevó a cabo con un lector Packard FusionReader.

10

Análisis de datos

Los resultados de cada placa se almacenaron y se valoraron con el programa informático de análisis de datos FusionDataAnalysis.

Resumen de los resultados del estudio

15 El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de señalización proinflamatoria del péptido AP301. Se usaron cultivos de sangre completa y la secreción de IL-6, un marcador muy sensible para la proestimulación inflamatoria, se cuantificó mediante ELISA.

Muestras de sangre completa de cinco voluntarios sanos se dejaron sin estimular (controles negativos), se estimularon con dosis altas y bajas de LPS (controles positivos) o se incubaron con el péptido en nueve diluciones semilogarítmicas de 10 µg/ml a 1 ng/ml. Los resultados se representan en la tabla siguiente:

20

Tabla: Liberación de interleucina-6 a partir de sangre completa nueva mediante adición de péptido AP301 y LPS

	péptido AP301	control positivo (LPS)
concentración	concentración de IL-6 (pg/ml, n = 5)	
0 (controle negativo)	menos de 0,5	menos de 0,5
10 mg/ml	menos de 0,5	195,640
1 mg/ml	menos de 0,5	108,370
3 ng/ml	menos de 0,5	34,867
1 ng/ml	menos de 0,5	sin determinar

Los resultados muestran claramente que el péptido AP301 no induce ninguna cantidad detectable de secreción de IL-6 en ninguna de las concentraciones analizadas. Los controles positivos (LPS) provocan una inducción significativa de la secreción IL-6.

25

Discusión

Los ensayos se llevaron a cabo para determinar si el péptido AP301 promueve la inducción de una cascada proinflamatoria. El parámetro de lectura fue la secreción inducida de IL-6 en cultivos de sangre completa de cinco donantes sanos. Los resultados mostraron claramente que el péptido AP301 no induce ningún nivel detectable de IL-6 en los cultivos de los donantes. Por lo tanto se demuestra que el péptido AP301 no induce ninguna respuesta proinflamatoria en el modelo ex vivo elegido y, por lo tanto, no presenta ninguna actividad de unión al receptor de TNF.

30

Ejemplo 4

Tratamiento de la inflamación pulmonar mediante administración de inhibidor de la neuraminidasa (zanamivir) o administración de una combinación de inhibidor de la neuraminidasa (zanamivir) y péptido AP301.

35

Se infectaron ratones de laboratorio (cepa C57BL/6, 8 semanas de edad) por vía nasal con la cepa del virus de la gripe A (PR8/34) y una dosificación de 150 UFP. A continuación recibieron los animales de ensayo en cada caso administraciones por vía nasal de 1,5 mg/kg de zanamivir (inhibidor de la neuraminidasa) y administraciones por vía intratraqueal de 50 µg/animal de ensayo de péptido AP301. El tratamiento se repitió los días 2° y 4° del ensayo.

Los días 7 y 9 después de la infección se extrajeron los pulmones, en cada caso, de 20 ratones y se determinó el peso pulmonar relativo como medida de la inflamación pulmonar. Los resultados se representan gráficamente en la figura 3.

- 5 El experimento determinó que el inhibidor de la neuraminidasa (zanamivir) ejerce un efecto solo moderado en la reducción de la inflamación pulmonar, medida mediante el peso pulmonar. No obstante, en los ratones infectados con el virus de la gripe a los que se administró además del inhibidor de la neuraminidasa (zanamivir) el péptido AP301 se pudo reducir de forma esencialmente significativa la inflamación pulmonar.

Resumen

- 10 Los péptidos según la invención presentan en combinación con un inhibidor de la neuraminidasa un efecto sinérgico en el tratamiento de infecciones por gripe.

- 15 En el documento WO 2010/099556 A1 se divulga, tal como se ha mencionado, un tratamiento de distintos síntomas pulmonares que apuntan a la hiperpermeabilidad de células epiteliales y células endoteliales en enfermedades pulmonares de este tipo. Según el documento WO 2010/099556 A1 se ha demostrado que los péptidos reivindicados son muy adecuados para la prevención y el tratamiento de estos síntomas. Aunque según el documento WO 2010/099556 A1 puede tratarse una hiperpermeabilidad de las células epiteliales y las células endoteliales también en caso de una infección con virus de la gripe (en el marco de una neumonía surgida con dicha infección), no lo sugiere con ello, por supuesto, la presente invención. La posibilidad de un tratamiento general de una gripe con un preparado de combinación que contiene estos péptidos representa una enseñanza nueva e inventiva frente a la idoneidad de los péptidos para el tratamiento (facultativo) de un síntoma provocado por la gripe.

- 20 La diferencia básica se presenta también observando los experimentos detallados según el documento WO 2010/099556 A1: En los ejemplos del documento WO 2010/099556 A1 se representa experimentalmente que los péptidos en los tejidos pulmonares:

- i) influyen en el contenido de oxígeno reactivo,
- 25 ii) influyen sobre el efecto de las toxinas gram-positivas bacterianas "listeriolisina" y "neumolisina" sobre una hiperpermeabilidad, entre otras cosas mediante la regulación del contenido de cadena ligera de miosina fosforilada, infiltración de leucocitos, proteína cinasa C activada,
- iii) después de infección por gripe influyen en el peso corporal,
- iv) después de infección por gripe influyen en la temperatura corporal,
- v) después de infección por gripe influyen en la tasa de supervivencia de los animales de ensayo.

- 30 No obstante, en la totalidad del documento WO 2010/099556 A1 no hay ninguna indicación experimental de que la infección de animales de ensayo con el virus de la gripe provoque una modificación del peso pulmonar relativo y de que un procedimiento de este tipo pueda detenerse y tratarse mediante la administración del péptido. Se muestra en general con la presente invención que la infección de pulmones de animales de ensayo con virus de la gripe provoca un aumento esencial del peso relativo de los pulmones.

- 35 Los pulmones representan en general, como órgano, uno de los órganos más importantes. Si se produce un aumento del peso pulmonar relativo, este está asociado con un perjuicio de la función pulmonar, y esto no puede compensarse con ningún otro órgano. Es una propiedad del pulmón sano contener la mayor cantidad posible de espacios rellenos de aire (alveolos). Al aumentar el peso pulmonar relativo debe asumirse de forma sólida que la proporción de alveolos rellenos de aire se reduce significativamente y, por lo tanto, la función pulmonar se ve limitada. Por lo tanto, el peso pulmonar relativo representa un factor esencial para el tratamiento de la gripe. Los resultados mostrados con los experimentos incluidos en la presente solicitud demuestran, por lo tanto, un efecto patente y sinérgico del preparado de combinación según la invención mediante un parámetro excepcionalmente crítico y relevante.

- 45 De los inhibidores de la neuraminidasa se sabe hasta la fecha que pueden reducir la propagación del virus de la gripe. Los inhibidores de la neuraminidasa no provocan una disminución del virus de la gripe vivo. Hasta la fecha no ha podido mostrarse en el estado de la técnica que el virus de la gripe provoque un aumento del peso pulmonar relativo. Solo con la presente invención se ha mostrado, sorprendentemente, que la administración de un inhibidor de la neuraminidasa después de una infección por gripe reduce el aumento de peso del peso pulmonar. Adicionalmente, con la presente invención ha podido mostrarse por primera vez que un tratamiento simultáneo en animales de ensayo infectados con virus de la gripe con una combinación de inhibidor de la neuraminidasa y un péptido según el documento WO 2010/099556 A1 provoca un efecto sinérgico claro y no previsible del peso pulmonar relativo. Mientras que los inhibidores de neuraminidas inhibirán la proliferación de virus de la gripe, los virus ya vivos, no obstante, no se reducen; la combinación sinérgica del inhibidor de la neuraminidasa y un péptido según la invención produce, evidentemente, una mejora esencial del tratamiento contra la gripe. Cada uno de los

medicamentos administrados individualmente (inhibidor de la neuraminidasa y el péptido reivindicado) no produce por sí solo el efecto mostrado con la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención no puede sugerirse de ningún modo mediante los resultados divulgados en el documento WO 2010/099556 A1.

5 Resumen de las secuencias:

SEC ID N° 1 CGQRETPEGAEAKPWYC

SEC ID N° 2 KSPGGQRETPEGAEAKPWYE

SEC ID N° 3 CGQREAPAGAAAKPWYC

SEC ID N° 4 TPEGAE

10 SEC ID N° 5 QRETPEGAEAKPWY

SEC ID N° 6 PKDTPEGAEALKPWY

SEC ID N° 7 CGPKDTPEGAEALKPWYC

SEC ID N° 8 CGQKETPEGAEAKPWYC

SEC ID N° 9 CGQRETPEGAEARPWYC

15 SEC ID N° 10 CGQRETPEGAEAKPC

SEC ID N° 11 CQRETPEGAEAKPWYC

SEC ID N° 12 CGQRETPEGAEAKFWYC

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende
- 5 - un péptido, que está constituido por 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TX¹EX²X³E, en el que X¹, X² y X³ pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, no presentando el péptido ninguna actividad de unión al receptor de TNF y estando ciclado, y
- un inhibidor de la neuraminidasa vírica.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que el péptido está constituido por 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TPEGAE.
- 10 3. Composición según la reivindicación 1 o 2, en la que el péptido ciclado está constituido por una secuencia de aminoácidos consecutivos, seleccionada del grupo constituido por QRETPEGAEAKPWY, PKDTPEGAELKPWY, CGQRETPEGAEAKPWYC, CGPKDTPEGAELKPWYC y fragmentos de al menos 7 aminoácidos de las mismas, fragmentos que presentan el hexámero TPEGAE.
4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** el péptido comprende la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC y está ciclado a través de los restos de C.
- 15 5. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** el péptido está ciclado a través de un puente disulfuro entre los restos de C.
6. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** el inhibidor de la neuraminidasa vírica es zanamivir u oseltamivir.
- 20 7. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada porque** comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y está preparada como composición farmacéutica adecuada para la administración a seres humanos.
- 25 8. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable que está seleccionado entre agua, en particular agua para inyectables, sal común, fosfato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, arginina, TRIS, citrato de sodio, solución de Ringer, dextrosa, manitol, trehalosa, sacarosa, sorbitol, fructosa, maltosa, lactosa o dextrano, solución de Hank, aceite fijado, oleato de etilo, sustancias que mejoran la isotonía y la estabilidad química, conservantes, proteínas farmacéuticamente aceptables, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos.
- 30 9. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque**, de forma independiente entre sí, comprende
- el péptido en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 10 µg a 1 g, particularmente de 1 mg a 100 mg, y
- el inhibidor de la neuraminidasa vírica en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 100 µg a 1 g, particularmente de 1 mg a 200 mg.
- 35 10. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** está presente en forma líquida y, de forma independiente entre sí, comprende
- el péptido en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 10 µg a 1 g, particularmente de 1 mg a 100 mg, y
- el inhibidor de la neuraminidasa vírica en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 100 µg a 1 g, particularmente de 1 mg a 200 mg,
- y está presente en un volumen de 0,5 a 10 ml, particularmente en un volumen de 1 a 5 ml.
- 40 11. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada porque** el péptido y/o el inhibidor de la neuraminidasa vírica están presentes en una formulación en polvo nebulizable o en una formulación líquida nebulizable.
12. Kit que comprende los componentes siguientes, en cada caso previstos en recipientes separados entre sí:
- 45 - un péptido que está constituido por 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TX¹EX²X³E, en el que X¹, X² y X³ pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, no presentando el péptido ninguna actividad de unión al receptor de TNF y estando ciclado, y
- un inhibidor de la neuraminidasa vírica.

13. Kit según la reivindicación 12, **caracterizado porque** los componentes previstos en cada caso en recipientes separados son tal como se definen en una de las reivindicaciones 1 a 11.

14. Composición que comprende

5 - un péptido que está constituido por 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TX¹EX²X³E, en el que X¹, X² y X³ pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, no presentando el péptido ninguna actividad de unión al receptor de TNF y está ciclado, y

- un inhibidor de la neuraminidasa vírica.

para usar en la prevención y el tratamiento de la gripe.

15. Composición que comprende

10 - un péptido que está constituido por 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TX¹EX²X³E, en el que X¹, X² y X³ pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, no presentando el péptido ninguna actividad de unión al receptor de TNF y estando ciclado, y

- un inhibidor de la neuraminidasa vírica

para usar en una inflamación pulmonar que está causada por la gripe.

15 **16.** Kit que comprende los componentes siguientes, en cada caso previstos en recipientes separados entre sí:

- un péptido que está constituido por 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TX¹EX²X³E, en el que X¹, X² y X³ pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, no presentando el péptido ninguna actividad de unión al receptor de TNF y estando ciclado, y

- un inhibidor de la neuraminidasa vírica

20 para usar en la prevención y el tratamiento de la gripe.

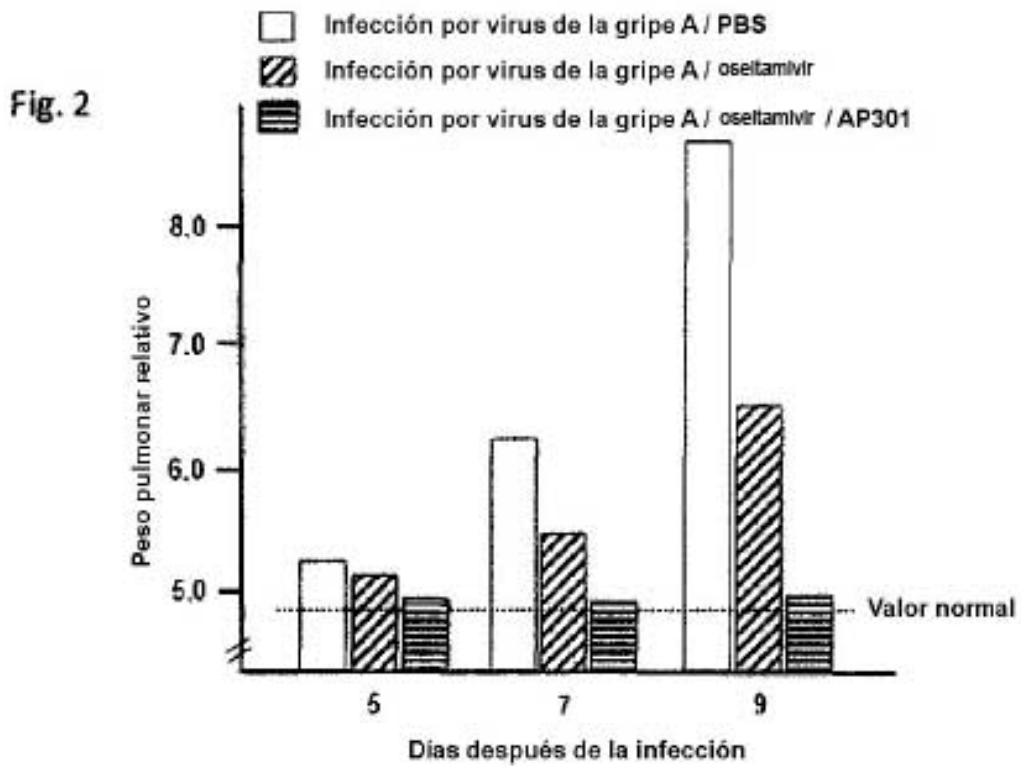


Fig. 3

