

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 269**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
A61K 31/731 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2014** **E 14152188 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 2898888**

54 Título: **Composición que comprende carragenina tipo iota contra conjuntivitis viral**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2019

73 Titular/es:
VISUFARMA B.V. (100.0%)
Amstelvein 1
1096 HA Amsterdam, NL

72 Inventor/es:
PRIESCHL-GRASSAUER, EVA;
MOROKUTTI-KURZ, MARTINA;
GRASSAUER, ANDREAS;
NAKOWITSCH, SABINE;
BODENTEICH, ANGELIKA;
KÖNIG-SCHUSTER, MARIELLE y
KOLLER, CHRISTIANE

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 734 269 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 carragenina tipo iota contra conjuntivitis viral

Campo técnico

5 La presente invención se encuentra en el campo de la virología y la medicina aplicada y se refiere a una composición para su uso como medicamento en el tratamiento profiláctico o terapéutico de la conjuntivitis inducida por virus.

Antecedentes de la invención

10 La queratoconjuntivitis epidémica (EKC) es una infección ocular grave y contagiosa que afecta tanto a la conjuntiva como a la córnea y es causada por adenovirus de tipo D, predominantemente de los serotipos 8, 19, 37. Se han aislado más de 50 serotipos de adenovirus y al menos 19 serotipos documentados causan infección ocular. Los serotipos asociados más comúnmente que causan EKC incluyen adenovirus 8, 19 y 37 y con menor frecuencia y en formas menos graves, serotipos 2-5, 7, 9, 10, 11, 14, 16, 21 y 29. Debido a los niveles bajos de inmunidad natural contra el adenovirus en la población general, es decir, los anticuerpos tipo 8 del adenovirus se encuentran en menos del 5 % de la población general en los Estados Unidos, todos los individuos se consideran susceptibles a la infección.

15 La EKC se caracteriza por síntomas típicos de conjuntivitis, como la aparición aguda de enrojecimiento con lagrimeo, sensación de cuerpo extraño y dolor intenso. Los síntomas incluyen además inflamación en la conjuntiva (conjuntivitis) y en la córnea (queratitis), dolor asociado, edema, disminución de la vista, lagrimeo, sensibilidad a la luz, impresión o sensación como si hubiera un cuerpo extraño en el ojo y el desarrollo de pseudo membranas. Durante la fase aguda, que persiste durante aproximadamente dos a tres semanas, los virus están presentes y se están replicando. En el caso típico, primero se infecta un ojo, después de lo cual la infección se propaga al otro dentro de dos o tres días. Ambos ojos se ven afectados en el 60 % de los casos. La infección en el primer ojo suele ser más grave. En aproximadamente 20 a 50 % de los pacientes, se desarrollan opacidades corneales que dan como resultado un deterioro de la visión que se mantiene durante semanas y meses y en casos raros incluso años. Dado que la enfermedad es a menudo de naturaleza epidémica, se denomina queratoconjuntivitis epidémica (EKC). La conjuntivitis por adenovirus es una infección de declaración obligatoria en Alemania (véase, por ejemplo, Meyer-Rüsenberg et al., Dtsch Arztebl Int 2011; 108 (27): 475-80) y está clasificada como una enfermedad infecciosa de categoría IV por la Vigilancia Epidemiológica Nacional de Japón de Enfermedades Infecciosas (NESID) con recopilación obligatoria, análisis y publicación de informes sobre sucesos.

20 La EKC aún carece de un tratamiento efectivo, por lo tanto, existe una gran necesidad médica no satisfecha. Las gotas oculares de povidona y yodo parecen tener una eficacia limitada y al mismo tiempo, causan una sensación de escozor adicional en los ojos inflamados y a veces, incluso la decoloración de la conjuntiva. Una composición farmacéutica más compatible que podría usarse para el tratamiento de EKC y para la prevención de su propagación sería, por lo tanto, altamente deseable para los pacientes que padecen la enfermedad, así como para las personas que entran en contacto con tales pacientes, como familiares y amigos, colegas, médicos.

25 A diferencia de otros subtipos de virus de la influenza que causan enfermedades respiratorias predominantes en los humanos, las infecciones por el virus de la influenza H7 con frecuencia producen síntomas oculares en lugar de respiratorios (Belsler et al., Emerg Infect Dis. 2009; 15:859-865) Por lo tanto, es altamente deseable que una formulación antiviral diseñada para el tratamiento de infecciones oculares víricas es eficaz durante los brotes de influenza que causan enfermedades oculares.

30 El uso de carrageninas como excipientes y viscosificadores en oftalmología está bien establecido. La patente de Estados Unidos no. 5,403,841 describe soluciones a base de carragenina que son útiles para preparar formulaciones de gotas oculares de ingredientes farmacéuticamente activos. En contacto con la película lagrimal, las soluciones forman un gel que mantiene el contacto prolongado con la conjuntiva, evitando la rápida eliminación del principio activo de la superficie del ojo y facilitando su administración tópica. Para una revisión extensa de los sistemas de gelificación oftálmicos in situ a base de carrageninas u otros polímeros cargados, ver, por ejemplo, Rupenthal et al., Int J Pharm. 2011; 411(1-2):69-77 y 78-85. Los sistemas poliméricos que contienen carragenina también son útiles para la administración transescleral de agentes macromoleculares (Thrimawithana et al., Eur J Pharm Sci. 2011; 44(3):399-409). Ninguna actividad farmacéutica intrínseca de las carrageninas se menciona o implica en ninguno de los documentos mencionados anteriormente.

35 Algunas preparaciones farmacéuticas oculares que emplean carrageninas como excipientes y/o mucomiméticos contienen agentes antivirales. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2007/039201 reivindica formulaciones fotoestables de brivudina para tratar la queratitis herpética. También se sabe que las carrageninas y los mucomiméticos poliméricos aniónicos relacionados se pueden usar en soluciones destinadas a la limpieza y almacenamiento de lentes de contacto, donde mejoran las propiedades astringentes de dichas soluciones que contienen agentes de bajo peso molecular con amplia actividad antimicrobiana, como peróxido de hidrógeno,

borato o cloruro de cetilpiridinio (véanse los documentos WO 2009/152028 y WO 2010/038129). Ninguna acción antiviral o antiinflamatoria se atribuye al componente de carragenina de estas soluciones.

5 Se sabe que las preparaciones oftálmicas a base de polímeros orgánicos naturales han sido diseñadas explícitamente para tratar la inflamación conjuntival. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2005/046562 reivindica ácidos hialurónicos sulfatados para tal fin terapéutico. Las carrageninas no se mencionan en esta divulgación.

10 Stiles et al. (Invest Ophthalmol Vis Sci 2008; 49(4):1496-1501) informan que el tratamiento de gatos que sufren de conjuntivitis herpética inducida experimentalmente con una preparación ocular de carragenina tipo lambda redujo la duración de la infectividad del animal, aunque el curso clínico de la conjuntivitis no fue disminuido. Este artículo aborda solo la inflamación conjuntival causada por el virus del herpes felino; no se mencionan los adenovirus y carrageninas distintos de los de la clase lambda.

En el documento WO 2009/027057 se divulgó un efecto antiviral de carragenina tipo iota contra los adenovirus de tipo B (respiratorios). En la misma aplicación se ha mencionado, sin embargo, que no se pudo determinar un efecto significativo contra los subtipos A, C y D.

15 El documento WO 2010/000437 describe composiciones que contienen carragenina tipo iota y/o kappa, así como su fabricación (reivindicación 7) para tratar afecciones alérgicas, en las que la afección alérgica puede ser conjuntivitis alérgica y el medicamento puede ser una espuma, gel, crema, gotas, pastillas, comprimidos, cápsulas, goma de mascar o polvo seco para la administración a la mucosa, inter alia, de los ojos.

20 LEIBBRANDT A. et al. (PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, vol. 5, no. 12, 1 December 2010 (2010-12-01), páginas e14320-1) reporta que la carragenina tipo iota es un potente inhibidor de la infección por el virus de la influenza A y tiene un efecto antiviral sobre la infección por el virus H1N1 y H3N2.

Breve descripción de la invención

25 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que la carragenina y en particular la carragenina tipo iota, se puede formular en una nueva composición farmacéutica para producir una eficacia antiviral contra los adenovirus de tipo D y las infecciones causadas por dichos adenovirus de tipo D, contrariamente al estado de la técnica actual discutido anteriormente en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención como se reivindica en las reivindicaciones independientes se relaciona entre otras a tales composiciones nuevas que se consideran útiles para la prevención o el tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica.

30 Como ya se reportó en el documento WO 2009/027057, la carragenina tipo iota no es eficaz contra los adenovirus de tipo D bajo condiciones fisiológicas, es decir, cuando el polímero se disuelve en una solución acuosa de NaCl al 0,9 %. Sin embargo, de manera incidental, se reveló que cuando la carragenina tipo iota se disuelve en agua sin NaCl, el polímero exhibe una eficacia asombrosa contra los adenovirus de tipo D.

35 Una investigación adicional sobre estos hallazgos inesperados dio como resultado la percepción de que una reducción del contenido de cloruro de sodio, en comparación con una solución fisiológica (0,9 %) de NaCl, en una solución ocular tópica lista para usar puede reducir drásticamente los valores de IC₅₀ de la carragenina tipo iota requeridos para la actividad contra el subtipo H7N7 del virus de la influenza A. Estas características permiten y recomiendan el uso del polímero para la prevención y el tratamiento de infecciones oculares causadas por los virus de la influenza A H7.

40 Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprenda carragenina tipo iota como un ingrediente antiviral activo en una cantidad eficaz antiviral, para su uso como medicamento en el tratamiento tópico profiláctico o terapéutico de infecciones víricas oculares causadas por adenovirus de subtipo D o virus de la influenza A de subtipo H7, con la condición de que la composición en su formulación lista para usar no contenga más del 0,5 % p/v de una sal de haluro metálico.

Descripción detallada de la invención

45 En una primera realización, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende carragenina tipo iota como un ingrediente antiviral activo en una cantidad eficaz antiviral, para su uso como un medicamento en el tratamiento tópico profiláctico o terapéutico de infecciones víricas oculares causadas por adenovirus de subtipo D o virus de la influenza A de subtipo H7, con la condición de que la composición en su formulación lista para usar no contenga más del 0,5 % p/v de una sal de haluro metálico.

50 "Conjuntivitis viral" significará una infección de la conjuntiva causada por un virus, según lo define el grupo de códigos B30 de la Clasificación Internacional de Enfermedades, versión 10 (ICD-10). En algunas realizaciones, la conjuntivitis viral es conjuntivitis o queratoconjuntivitis debida a una infección por adenovirus (códigos ICD-10 B30.1 y B30.0, respectivamente). En otras realizaciones, la conjuntivitis viral puede ser causada por otros virus o virus no especificados (códigos ICD-10 B30.8 y B30.9) y puede ser causada, por ejemplo, por la cepa H7N7 del virus de la influenza A.

55

En el contexto de la presente invención, los términos "tratar" o "tratamiento" significarán intervenciones terapéuticas que pretenden modificar el curso clínico de la conjuntivitis viral de tal manera que los síntomas clínicos como el enrojecimiento y el dolor ocular, los trastornos de la visión y el flujo de lágrimas, etc., son menos graves que sin intervenciones con preparaciones de acuerdo con la invención; o que dichos síntomas clínicos persisten por períodos más cortos; o que es disminuido el período de tiempo durante el cual un individuo infectado que tiene dichos síntomas sigue siendo capaz de transmitir los agentes infecciosos que causan conjuntivitis viral a otro individuo; o cualquier combinación de dichos efectos.

Del mismo modo, en el contexto de la presente invención, los términos "prevenir" o "prevención" significarán que no se produce una infección viral o que no aparecen síntomas clínicamente relevantes de una infección viral en un ojo sano que se haya expuesto primero a una preparación de acuerdo con la presente invención y que se ha expuesto posteriormente a una cantidad de agente vírico infeccioso que, de otro modo, es decir, en la ausencia de dicho pretratamiento, sería suficiente para provocar conjuntivitis vírica. "Prevenir parcialmente" significará que la conjuntivitis viral, si se desencadena por el agente viral infeccioso a pesar del pretratamiento del ojo con una preparación de la presente invención, se manifiesta con síntomas que son menos graves que sin pretratamiento o que muestran un inicio tardío o que se resuelve antes.

Las preparaciones de acuerdo con la presente invención típicamente contienen carragenina, preferiblemente carragenina tipo iota, como un ingrediente antiviral activo o como el único ingrediente activo antiviral en una concentración de 0,05 % a 1 % en peso, preferiblemente de 0,1 a 0,5 % y lo más preferiblemente de 0,1 a 0,3 % en peso de la preparación lista para usar. Además, están esencialmente libres de sales de haluros metálicos, como el cloruro de sodio o potasio, o no contienen más del 0,5 % (p/v), preferiblemente no más del 0,1 % (p/v) de una o más sales de haluros metálicos. Las sales de haluro metálico se usan frecuentemente en formulaciones galénicas como agentes de ajuste de tonicidad iónica. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas líquidas a base de una solución de cloruro de sodio "fisiológica" generalmente comprenden un 0,9 % p/v de cloruro de sodio. "Esencialmente libre" en este contexto significa que las composiciones de la presente invención no contienen más que rastros de cantidades de sales de haluros metálicos posiblemente originadas de impurezas de otros ingredientes presentes en la composición.

Las composiciones oftálmicas administrables por vía tópica de acuerdo con la presente invención pueden tener un valor de pH dentro de un intervalo de 3,5 a 8,0, normalmente un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, y una osmolalidad de aproximadamente 220 a 320 mOsm/kg. Sin embargo, para diversas aplicaciones, puede ser preferible ajustar la osmolalidad a valores ligeramente hipotónicos, dichos valores típicamente están dentro de un intervalo de 170 a 250 mOsm/kg y más específicamente dentro de un intervalo de 190 a 220 mOsm/kg, con el fin de compensar la hipertonicidad de la película lagrimal debido a una enfermedad o evaporación excesiva en pacientes con conjuntivitis. De acuerdo con la presente invención, el ajuste de la osmolalidad se lleva a cabo sin el uso de agentes de tonicidad iónicos y particularmente sin el uso de sales de haluros metálicos tales como NaCl o KCl. En cambio, la osmolalidad deseada se puede ajustar agregando al menos uno de un azúcar de bajo peso molecular y un alcohol polivalente de bajo peso molecular ("poliol"). Los azúcares adecuados pueden seleccionarse del grupo de monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos y típicamente de glucosa, fructosa, manosa y sacarosa. Los alcoholes polivalentes adecuados, típicamente alcoholes de azúcar de cadena corta que tienen un esqueleto de 3 a 12 átomos de carbono, pueden seleccionarse del grupo de glicerol, eritritol, sorbitol, manitol, xilitol, treitol, inositol y maltitol.

La formulación oftálmica tópica de acuerdo con la presente invención puede comprender uno o más agentes de ajuste de pH o sistemas reguladores compatibles oftalmológicamente que evitan el cambio del pH durante el almacenamiento. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, ácido bórico, borato de sodio, citrato de potasio, ácido cítrico, bicarbonato de sodio y diversos reguladores de fosfato inorgánico tales como Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 y mezclas de estos. Las fuerzas iónicas mínimas introducidas por cualquiera de tales agentes de ajuste del pH no interfieren con la esencia de la invención.

También, la formulación oftálmica tópica de la presente invención puede comprender uno o más tensioactivos compatibles oftalmológicamente. El tensioactivo facilita la propagación de la formulación a través de la superficie del ojo y puede ser no iónico o aniónico. Los tensioactivos no iónicos de ejemplo incluyen tiloxapol, ésteres de sorbitano de polioxietileno, aceites de ricino polietoxilados, poloxámeros, tensioactivos de polioxietileno/polioxipropileno, estearato de polioxietileno, estearato polioxietileno propilenglicol, hidroxialquilfosfonato, ésteres y éteres de ácido láurico o palmítico, oleato de trietanol amina o una combinación de los agentes anteriores u otros agentes conocidos por las personas experimentadas en la técnica. El tensioactivo, cuando se incluye, suele estar presente en una concentración de entre el 0,02 % (p/v) y el 0,1 % (p/v) de la composición.

En algunas realizaciones, la presente formulación oftálmica tópica puede contener uno o más conservantes para inhibir el crecimiento microbiano y prolongar la vida útil. Los conservantes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio, edetato disódico (EDTA), policuaternio-1, biguanida de polihexametileno y perborato. La cantidad de conservante suele ser inferior a aproximadamente el 0,01 % (p/v) de la composición total.

Además de los ingredientes anteriores, se contempla que una variedad de ingredientes adicionales o alternativos pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, cuyos ingredientes alternativos incluyen, sin limitación, antioxidantes tales como la vitamina E o sus derivados disponibles comercialmente tales como tocoferol polietilenglicol succinato 1000 (TPGS), ácido ascórbico o metabisulfito de sodio.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se proporcionan típicamente en forma estéril para administración tópica a la parte frontal del ojo y se ajustan preferiblemente para la autoadministración por parte del individuo que lo necesite. En una realización, la formulación es una gota ocular sin partículas. Se conocen diversos recipientes en la técnica que son adecuados para dispensar gota a gota líquidos a la superficie ocular a través de una boquilla de una manera que puede ser controlada fácilmente por un individuo durante la autoadministración de dichas gotas. Preferiblemente, un sistema típico de recipiente+boquilla está diseñado para mantener la esterilidad de las gotas oculares durante el uso repetido.

Otras formulaciones galénicas dentro del alcance de la invención incluyen hisopos, pomadas o geles oftalmológicamente aceptables que se pueden aplicar al ojo como aspersores o aerosoles, o geles que se pueden administrar dentro del saco conjuntival. Para cada una de estas formulaciones, se conocen en la técnica diversos productos o sistemas de aplicación que están diseñados para dispensar tales formulaciones al frente del ojo sin riesgo de daño mecánico a la superficie ocular.

Para aplicaciones especiales, las presentes composiciones farmacéuticas también pueden formularse en dispositivos de liberación controlada que se colocan de forma transitoria dentro del saco conjuntival o se disuelven in situ mientras liberan la preparación de carragenina de acuerdo con la invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación gráfica de los resultados de la prueba del ejemplo 6, en la que se probó el efecto antiviral de la carragenina tipo iota sobre la supervivencia de ratones infectados intraocularmente con el virus de la influenza aviar A/H7N7; se infectaron 10 ratones por grupo con influenza A/pavo/Alemania/R11/01 H7N7 y se trataron durante un período de diez días, dos veces al día con la composición farmacéutica descrita en el ejemplo 4 o con un placebo, respectivamente. La terapia se inició inmediatamente después de la infección.

En el eje x se indica el tiempo de supervivencia (días) y en el eje y el % de ratones supervivientes; I= preparación de carragenina tipo iota (línea negra); P= placebo (línea discontinua).

Ejemplo 1

Procedimiento para la determinación de valores de IC₅₀ para adenovirus

Se sembraron células A549 en placas de 96 pocillos con una densidad celular de $1,7 \times 10^4$ células por pocillo y se cultivaron durante 24 horas en un medio de cultivo de tejido DMEM estándar que contenía 4,5 g/l de glucosa. Se preparó una suspensión vírica que contenía cantidades variables de polímero de carragenina y NaCl y se incubó durante un período mínimo de 20 minutos. Las células se infectaron con la suspensión de virus que contenía la sustancia de prueba (= polímero de carragenina) a una concentración dada y con un título de virus de $1,3 \times 10^3$ unidades infecciosas por pocillo. Una hora después de la infección, se eliminó el inóculo del virus y se añadió un recubrimiento semilíquido que contenía un 2,5 % p/v de carboximetilcelulosa (CMC), el polímero de carragenina y la concentración de sal de NaCl en la cantidad a analizar. Las células se incubaron durante 5 días a 37 °C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se lavaron las células 3 veces con PBS y se fijaron para inmunotinción con una mezcla de metanol/acetona enfriada con hielo (1:1). Las células se incubaron adicionalmente durante 45 minutos con regulador de bloqueo (Biolegend) y se incubaron con un anticuerpo antiadenovirus de ratón a una dilución de 1:1.000. Después de la incubación durante 1 hora, las células se lavaron nuevamente 3 veces con un regulador de lavado que contenía Tween 20 al 0,1 % y luego se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP a una dilución de 1:1.000. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS, después de lo cual se añadió el sustrato TMB (Biolegend). Después de un tiempo de reacción de 10 minutos, la reacción se detuvo añadiendo ácido sulfúrico 1N.

La absorbancia se midió a 450 nm. La absorbancia de las células infectadas no tratadas se ajustó al 100 %, mientras que la absorbancia de las células tratadas no infectadas se ajustó al 0 %. El cálculo de los valores de IC₅₀ se realizó con el software de ajuste estándar ExcelFit. De manera paralela, el efecto del procedimiento en células no infectadas se determinó tiñendo y fijando las células con una solución de cristal violeta que contenía formaldehído al 4 %. No se detectó ningún efecto negativo significativo del polímero y las diferentes concentraciones de sal probadas en las células no infectadas.

Tabla 1: los valores de IC₅₀ de la carragenina tipo iota sobre tres tipos de adenovirus dependen de la concentración de NaCl. Todos los valores en µg/ml. [MA= manitol]

	NaCl al 0,9 %	NaCl al 0,5 %	NaCl al 0,2 %	NaCl al 0 %	NaCl al 0 % + 200 mOsm/l MA
AdV 8	>200	199	72	38	56
AdV 19	>200	76	42	29	36
AdV 37	>200	195	37	29	69

5 Como se muestra en la tabla 1, la carragenina tipo iota no es eficaz contra los adenovirus 8, 19 y 37 cuando el cloruro de sodio está presente en concentraciones fisiológicas. A una concentración de 0,5 % de NaCl se puede detectar la eficacia antiviral. En ausencia de NaCl, la IC₅₀ de la carragenina tipo iota está entre 29 y 38 µg de carragenina tipo iota por 1 ml de la solución de recubrimiento experimental.

10 La efectividad antiviral se conserva cuando se agrega manitol hasta que se alcanza una osmolaridad de 200 mOsmol/l (NaCl al 0 % +200 mOsm/l MA). Para lograr los resultados mostrados en la Tabla 1, se añadió manitol a una concentración de 36,4 mg/ml a una solución que contenía 1,2 mg/ml de carragenina tipo iota, correspondiente a una osmolaridad de 193 mOsm/kg.

Ejemplo 2:

Procedimiento para la determinación de valores de IC₅₀ para el virus de la influenza A H7N7

15 El ensayo se realizó en células MDCK en una configuración con preincubación profiláctica de virus y muestra de prueba experimental, infección de las células y tratamiento postinfección utilizando un medio de recubrimiento semilíquido con 2,25 % de carboximetilcelulosa (CMC). La matriz de ensayo estaba compuesta por medio y matriz de muestra en una proporción de 2:1, resultante de la dilución inicial 1:3 de las soluciones madre.

20 El ensayo se estableció en 6 réplicas para cada concentración de muestra de prueba y para control infectado y no infectado. La infección simulada (control de toxicidad) se realizó por triplicado. Las concentraciones finales de la carragenina tipo iota fueron 400, 120, 36, 10,8, 3,2, 0,97, 0,3, 0,09 µg/ml (diluciones en serie de 1:3,33). Se sembraron 1,7x10⁴ células en placas de cultivo tisular de 96 pocillos para que alcanzaran aproximadamente 90 % de confluencia 24 a 28 horas después. Se mezclaron volúmenes iguales de dilución de virus doble concentrada y series de dilución de muestra de prueba doble concentrada y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La muestra de prueba sin virus y el medio solo se agregaron al control infectado y no infectado, respectivamente. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 45 minutos. Luego, el inóculo se diluyó y se dispensó en alícuotas de 1 ml a tubos redondos de 5 ml, preparando 1 tubo para cada concentración de muestra de prueba. Se transfirieron 4 ml de medio CMC por placa de ensayo a un tubo cónico de 50 ml para preparar el medio de recubrimiento para los controles infectados y no infectados.

30 Las soluciones madre se diluyeron a 800 µg/ml de carragenina tipo iota con medio de ensayo suplementado con tripsina, produciendo una mezcla de medio y matriz de muestra en una proporción de 1:2 con tripsina de 1:500. Se realizaron diluciones seriadas subsiguientes manteniendo las condiciones de la matriz fijas. Se añadió 1 ml de dilución de la muestra de prueba a 1 ml de medio CMC y se agitó en vórtice vigorosamente. El medio CMC para los controles infectados/no infectados se combinó con un volumen igual de una mezcla de medio de ensayo y matriz 1:2 que contenía tripsina 1:500 y se mezcló vigorosamente. Los medios de recubrimiento se mantuvieron a 37°C en un baño de agua. Poco antes de su uso, las soluciones se agitaron en vórtice brevemente y se vertieron en los pocillos de una placa de pocillos profundos. Medio de recubrimiento final: Opti-Pro con L-glutamina 4 mM, ABAM, tripsina 1:1.000 y CMC al 2,25 %. El mismo procedimiento se realizó en ausencia del virus como un control de toxicidad.

40 Para la inmunotinción, el medio de recubrimiento se diluyó con 100 µl de PBS y se aspiró. Se añadieron 100 µl de PBS a cada pocillo. Las placas se sometieron a una breve agitación vigorosa en un agitador de microplacas a la velocidad máxima antes de que se aspirara el PBS. El lavado se repitió dos veces o más a menudo si los cristales de CMC todavía estaban descansando sobre la capa celular. Se añadieron 100 µl de fijador de

metanol/acetona frío, las placas se incubaron durante 20 a 30 minutos a -20 °C y se dejaron secar después de la eliminación del fijador.

Después de 1 hora de incubación con 100 µl de regulador de bloqueo, las placas se lavaron una vez con PBS y se incubaron con 50 µl de dilución de anticuerpo (anti-NP 1:500) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección se añadió después del lavado (dilución 1:1.000) y se mantuvo en contacto durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual las placas se vaciaron y se lavaron nuevamente tres veces con regulador de lavado y una vez con PBS. Se añadieron 100 µl de sustrato. Se llenaron 6 pocillos w/o (= sin) células con sustrato y sirvieron como blanco. Después de 10 a 15 minutos, la reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 1N. Se transfirieron 100 µl a placas de fondo plano de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 450 nm.

Evaluación: la media de las muestras en blanco se restó de todos los valores medidos y se calcularon las medias de 6 repeticiones (datos sin procesar). Las medias de las muestras no infectadas se restaron de todos los valores medidos. Los valores se normalizaron a la media de las muestras infectadas y los valores resultantes se restaron de 100 para producir una inhibición como porcentaje de muestras no infectadas. En un diagrama, la inhibición y los datos sin procesar corregidos en blanco se trazaron frente a la concentración de la dilución de carragenina tipo iota. Los valores de IC₅₀ se calcularon como se describe anteriormente para los adenovirus.

Tabla 2: los valores de IC₅₀ de carragenina tipo iota en el virus de la influenza H7N7 dependen de la concentración de NaCl. Todos los valores en µg/ml [MA= 200 mOsm/l manitol]

	NaCl al 0,9 %	NaCl al 0,5 %	NaCl al 0,2 %	NaCl al 0 %	NaCl al 0 % + MA
H7N7	>50	3,5	1,9	<0,09	<0,09

Ejemplo 3: Preparación de gotas oculares antivirales para el tratamiento de infecciones oculares

Carragenina tipo iota: 2,4 mg/ml

Manitol: 36,4 mg/ml

Osmolaridad: 200 mOsm/l (osmolalidad: 192 mOsm/kg)

Viscosidad: 76 mPa.s

Agua ad 100 %

Ejemplo 4: Formulación antiviral de gotas oculares para el tratamiento de infecciones oculares

Carragenina tipo iota: 1,2 mg/ml

Manitol: 36,4mg/ml

Osmolaridad: 200 mOsm/l (osmolalidad: 193 mOsm/kg)

Viscosidad: 8-15 mPa.s

Agua ad 100 %

Ejemplo 5:

Un voluntario masculino sufría de queratoconjuntivitis durante aproximadamente 10 días consecutivos. El paciente reportó enrojecimiento de los ojos, aumento del flujo de lágrimas, picazón y ardor en ambos ojos probablemente causados por una infección viral. El voluntario fue tratado con la solución de gotas oculares del ejemplo 3 en un régimen de dosificación de 5 gotas por ojo 3 veces al día durante 5 días. Ya después del primer día, el voluntario reportó una reducción de los síntomas como picazón y enrojecimiento. La condición patológica mejoró continuamente durante la terapia y en el día 5 se suspendió la terapia debido a la ausencia completa de síntomas clínicamente relevantes. No hubo recaída dentro de un período de observación de 14 días.

Ejemplo 6: Efecto antiviral de carragenina tipo iota en ratones infectados intracornealmente con el virus de la influenza aviar A/H7N7

El virus de la influenza tipo H7N7 ingresa predominantemente al cuerpo a través de la infección de los ojos. El tipo H7N7 ha demostrado ser altamente patógeno para humanos y ratones. En el peor de los casos, podrían producirse consecuencias letales si el virus se propaga desde la ubicación primaria de la infección al pulmón. En

ratones C57BL6, la infección intraocular con el virus de la influenza H7N7 A/Turquia/ Alemania/R11/01 produce un resultado letal. Este modelo se utilizó para probar la composición farmacéutica descrita en el ejemplo 4.

5 Los ratones C57BL6 de tres semanas de edad (10 por grupo) se infectaron intraocularmente con 5 µl de suspensión que contenía $1,5 \times 10^5$ unidades formadoras de placa (pfU) del virus de la influenza H7N7 A/pavo/Alemania/R11/01. La terapia se inició inmediatamente después de la infección con una preparación de placebo que contenía 36,4 mg/ml de manitol o con la preparación descrita en el ejemplo 4. Los ratones se trataron durante un período de diez días, dos veces al día con la preparación de carragenina tipo iota o placebo, respectivamente. Después de 14 días, el 80 % de los ratones tratados con placebo habían muerto. En contraste, el 50 % de los ratones tratados con carragenina tipo iota habían sobrevivido y se habían recuperado de la infección (ver Figura 1). Una evaluación estadística con una prueba de log-rank (Prism 5 versión 5.02) reveló una diferencia significativa entre los dos grupos con un valor de p de 0,0492. Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento intraocular de ratones con una preparación de carragenina tipo iota como se describe en el ejemplo 4 produce un efecto significativo en la supervivencia de ratones infectados intraocularmente con una dosis letal del virus de la influenza H7N7.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende carragenina tipo iota como un ingrediente antiviral activo en una cantidad eficaz antiviral, para su uso como un medicamento en el tratamiento tópico profiláctico o terapéutico de infecciones víricas oculares causadas por adenovirus de subtipo D o virus de influenza A de subtipo H7, con la condición de que la composición en su formulación lista para usar no contenga más del 0,5 % p/v de una sal de haluro metálico.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición no contiene más del 0,1 % p/v de dicha sal de haluro metálico o está esencialmente libre de una sal de haluro metálico.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que la sal de haluro metálico se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio y cloruro de potasio.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un agente de ajuste de osmolalidad seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polioles de bajo peso molecular.
- 15 5. La composición de la reivindicación 4, en la que el agente de ajuste de osmolalidad se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa, sacarosa, manosa, glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, inositol, xilitol, treitol y maltitol.
6. La composición de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además al menos un aditivo oftalmológicamente compatible seleccionado del grupo que consiste en un agente de ajuste de pH, un tensioactivo, un conservante y un antioxidante.
- 20 7. Carragenina tipo iota en una cantidad eficaz antiviral para su uso en el tratamiento tópico profiláctico o terapéutico de infecciones virales oculares causadas por adenovirus de subtipo D o virus de influenza A de subtipo H7, con la condición de que la composición en su formulación lista para usar no contenga más del 0,5 % p/v de una sal de haluro metálico.
- 25 8. Carragenina tipo iota en una cantidad eficaz antiviral para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición no contiene más del 0,1 % p/v de dicha sal de haluro metálico, o está esencialmente libre de una sal de haluro metálico.
9. Carragenina tipo iota en una cantidad eficaz antiviral para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la composición comprende además un agente de ajuste de osmolalidad seleccionado del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polioles de bajo peso molecular.
- 30 10. Carragenina tipo iota en una cantidad eficaz antiviral para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el agente de ajuste de osmolalidad se selecciona del grupo que consiste en glucosa, fructosa, manosa, sacarosa, glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, inositol, treitol, xilitol y maltitol.
- 35 11. Carragenina tipo iota en una cantidad eficaz antiviral para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición comprende además al menos un aditivo oftalmológicamente compatible seleccionado del grupo que consiste en un agente de ajuste de pH, un tensioactivo, un conservante y un antioxidante.

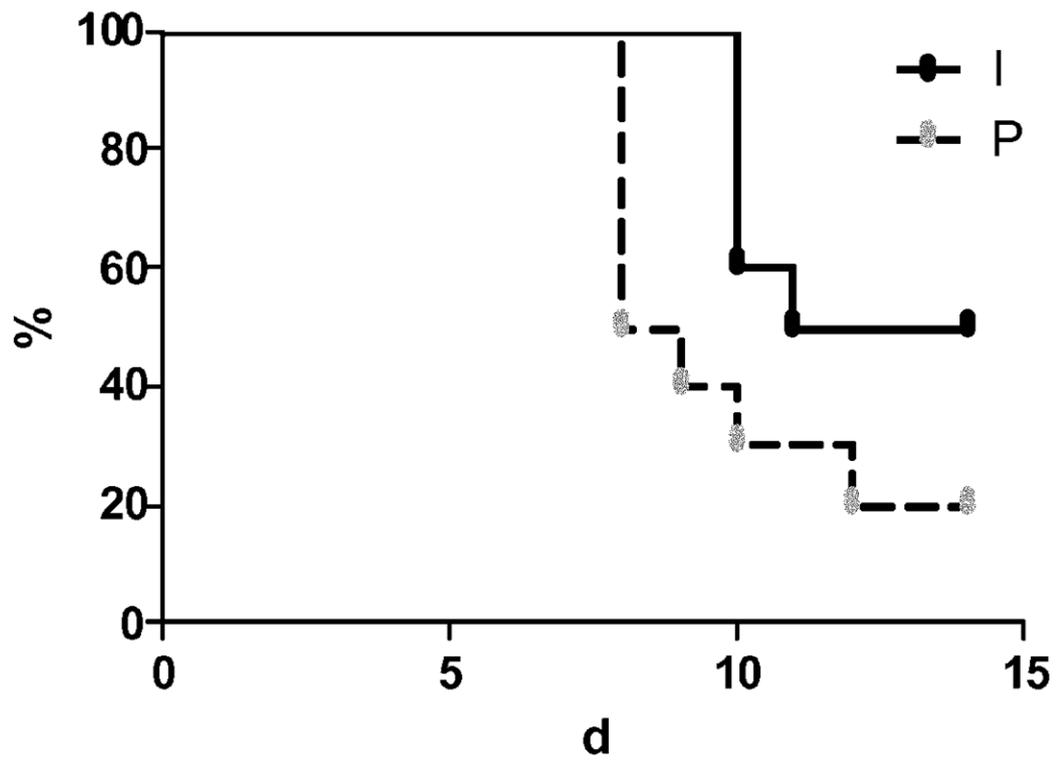


Fig. 1