



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 941**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/185** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 31/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04706141 .1**  
86 Fecha de presentación : **29.01.2004**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1596851**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Uso de 2-mercaptoetanosulfonato como antiviral.**

30 Prioridad: **04.02.2003 IT MI03A0175**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2007**

73 Titular/es: **Fabio Piazza**  
**Via Ughi, 17**  
**43100 Parma, IT**  
**Giorgio Conti;**  
**Pietro Portincasa y**  
**Carlo Zini**

72 Inventor/es: **Piazza, Fabio;**  
**Conti, Giorgio;**  
**Portincasa, Pietro y**  
**Zini, Carlo**

74 Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

ES 2 280 941 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).

# ES 2 280 941 T3

## DESCRIPCIÓN

Uso de 2-mercaptoetanosulfonato como antiviral.

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el uso de 2-mercaptoetanosulfonato sódico como antigripal en medicina humana y/o veterinaria.

### 10 **Estado anterior de la técnica**

El 2-mercaptoetanosulfonato sódico (de aquí en adelante denominado MESNA) ha sido utilizado por algún tiempo como mucolítico, gracias a su capacidad para romper los puentes disulfuro de las cadenas polipeptídicas del moco, para el tratamiento de patologías del aparato respiratorio, como bronquitis crónica, asma, enfisema, fibrosis quística y rinitis (consulte por ejemplo, US 3 567 835; Semczuk *et al.*, Otolaryngologia Polska, 34(6), 1980, 553-558; Damborenea Tejada *et al.*, O.R.L-DIPS, 24(3), 1997, 102-106; Motta *et al.*, Rivista Italiana di Otorinolaringologia Audiologia e Foniatria, 15(1), 1995, 61-65) y en el tratamiento posoperatorio en combinación con fisioterapia respiratoria, para promover la expectoración y evitar las complicaciones pulmonares. Además, el MESNA se usa en oncología para la prevención de lesiones de las vías urinarias debidas a antineoplásicos como la ciclofosfamida (consulte por ejemplo, EP 591 710 y EP 334 083).

Finalmente, EP 930 878 divulga el uso de MESNA en cirugía, en forma de formulaciones tópicas, en particular soluciones estériles, para la aplicación directa durante la intervención quirúrgica de tejidos normales y/o patológicos, para facilitar la disección.

En WO 01/42780, se demostró que el MESNA puede desmontar *in vivo* partículas similares a las del papilomavirus después de la exposición prolongada a altas concentraciones de MESNA.

En la actualidad se encontró que el MESNA ejerce una acción notable contra los virus de la gripe. Por consiguiente la presente invención se relaciona con el uso de MESNA en el tratamiento de infecciones por el virus de la gripe.

### **Experimentación farmacológica**

Se estudió el efecto "*in vitro*" del MESNA sobre el ciclo multiplicador de dos virus de ARN de polaridad negativa: el virus de la gripe humana A NWS/33, H1N1, y el virus de la gripe aviar A Ulster/73, H7N1, que pertenecen a la familia Orthomyxoviridae.

### **Materiales y métodos**

#### 40 *Cultivos celulares y cepas de virus*

Se multiplicaron cultivos monocapa de células epiteliales de riñón de mono LLC (LLC-MK2) y células de riñón canino Madin Darby (NOCK) en medio mínimo esencial con sales de Earle (M.E.M. Earle) complementado con suero de feto de ternero hasta una concentración final de 10%. La variante neurotrópica humana, cepa NWS (H1N1), del virus de la gripe tipo A se cultivó en la cavidad alantoica de embriones de pollo en desarrollo. Después de 48 horas de cultivo, el líquido alantoico se cosechó, se centrifugó a 5.000 rpm durante 30 minutos para eliminar los detritos celulares, se tituló por hemaglutinación con eritrocitos humanos grupo O Rh+, se sembró en placas y se usó como inóculo para todos los experimentos.

Los resultados obtenidos con la cepa de la gripe humana se confirmaron y respaldaron posteriormente usando también virus de la gripe tipo A, Ulster/73, H7N1, que es un modelo del virus de la gripe aviar.

#### *Efecto del tratamiento con MESNA sobre el crecimiento viral*

Se infectaron monocapas confluentes de células LLC-MK2 con diferentes diluciones de virus A/NWS/33 en solución amortiguadora de fosfato (P.B.S.) de pH 7,4. Después de 45 minutos de adsorción, las monocapas de células LLC-MK2 se trataron con diferentes cantidades de MESNA para definir la concentración del compuesto que inhibía completamente el crecimiento viral; las cantidades utilizadas de compuesto fueron 0,5, 1, 2, 5, 10, 15 y 20 mg/ml, que se agregaron al medio de mantenimiento desde el comienzo de la infección y que se dejaron durante todo el experimento. Después de 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas post infección (p.i.) se recogió el sobrenadante de las monocapas de células infectadas y tratadas, se centrifugó a 2.500 rpm para eliminar los detritos celulares y se analizó por hemaglutinación (presencia/ausencia de partículas virales maduras).

El MESNA demostró que es capaz de suprimir la producción viral en células LLC-NM a todas las concentraciones probadas.

En un conjunto diferente de experimentos, el MESNA no interfirió con los receptores específicos para el virus ubicados en los eritrocitos utilizados para el ensayo de hemaglutinación.

## ES 2 280 941 T3

### *Experimentos postratamiento*

Se realizaron experimentos postratamiento para dilucidar cuál estadio de la replicación viral era afectado principalmente por el MESNA. En diferentes momentos después del comienzo de la infección, se agregó MESNA al medio de mantenimiento de las monocapas de células LLC-MK2 infectadas y se dejó hasta 24, 48 y 72 horas post infección. La producción de partículas virales se evaluó mediante titulación por hemaglutinación.

El agregado de MESNA demostró ser eficaz hasta 6 horas post infección.

### 10 *Reversibilidad*

También se realizaron experimentos de reversibilidad para dilucidar las características generales de la unión del MESNA al objetivo.

15 Se infectaron monocapas celulares de células LLC-MK2 y se trataron con MESNA; después se desechó el medio de mantenimiento que contenía MESNA 1, 2, 4, 5, 6, 8 y 10 horas p.i. y se agregó medio de mantenimiento sin MESNA que se dejó hasta 24, 48 y 72 horas post infección. Se llevaron a cabo titulaciones por hemaglutinación después de 24, 48 y 72 horas de infección: el MESNA mostró una inhibición irreversible en la producción de partículas virales en todos los tiempos de la prueba.

20

### *Prueba de hemadsorción en células LLC-MK2 infectadas tratadas con MESNA*

Esta prueba se llevó a cabo para verificar el adecuado papel biológico del polipéptido viral hemaglutinina (HA), porque una hemadsorción correcta de los eritrocitos se correlaciona no sólo con la integridad de la molécula de hemaglutinina glucosilada sino también con su correcta inserción en las membranas celulares de las células infectadas.

30 Se controló la presencia del antígeno hemaglutinina viral HA en la superficie celular de monocapas de células LLC-MK2 infectadas, tratadas o sin tratar con MESNA, a las 24 y 48 horas post infección mediante la prueba de hemadsorción realizada según la técnica de Finter. Como resultado, se observaron diferencias significativas entre células infectadas tratadas y sin tratar. Los valores de hemadsorción obtenidos indican una gran reducción, si no la ausencia, de las moléculas de hemaglutinina en la superficie de las células infectadas y tratadas con MESNA.

### *Efecto del tratamiento con MESNA sobre la síntesis de proteínas virales*

35 Se infectaron monocapas confluentes de células LLC-MK2 con A/NWS/33; después que se desechó el inóculo de virus, las células infectadas se trataron con MESNA a una concentración de 20 mg/ml. En diferentes momentos después de la infección, se marcaron las monocapas de células confluentes con [<sup>35</sup>S]-metionina (20 μCi/ml) en un medio sin metionina que contenía 2% de suero de feto de ternero dializado. En general las células se incubaron previamente durante un período de privación de 40 minutos en medio sin metionina.

40

A los 30 minutos del marcado, las células se lavaron en solución estéril de NaCl al 0,9% (solución salina de Puck), se rasparon con un rascador de goma para teflón, se aglomeraron mediante centrifugación a 2.500 xg durante 5 minutos y después se lisaron con tampón de lisis de Laemmli antes de la electroforesis en gel de poliacrilamida con S.D.S al 15% a 50 voltios. Los polipéptidos inducidos por virus se visualizaron por autorradiografía en películas Kodak para rayos X. El tratamiento con MESNA determinó una acentuada reducción de la síntesis normal de polipéptidos inducidos por virus: se inhibió en gran medida la síntesis tanto de las proteínas virales tempranas como de las tardías. El efecto inhibidor fue particularmente evidente cuando se usaron cantidades de MESNA capaces de bloquear la producción del virus, a saber 1, 2, 5, 10 y 15 mg/ml.

### 50 *Estudios comparativos*

También se realizó otro conjunto de experimentos, usando el compuesto comercial MUCOLENE, que consiste en MESNA y edetato de sodio. Los resultados fueron equivalentes a los obtenidos con MESNA solo. Para poner en evidencia cualquier posible acción, incluso sinérgica, del edetato de sodio, todos los experimentos se repitieron con edetato de sodio solo: los resultados obtenidos demostraron que el edetato de sodio no fue capaz de ejercer una acción antiviral a ninguna de las concentraciones probadas.

### *Conclusiones*

60 Los resultados obtenidos con el virus de la gripe aviar A/Ulster/73, cepa H7N1 fueron completamente reproducibles y totalmente equivalentes a los obtenidos con el virus de la gripe humana, A/NWS/33, cepa H1N1, según se describió precedentemente.

También se debe recalcar que la acción antiviral se ejerce mediante la inhibición no sólo de la producción de partículas virales maduras, sino también de la síntesis de cualquier proteína específica del virus.

65

Los resultados de la experimentación farmacológica fueron confirmados por pruebas clínicas en voluntarios.

## ES 2 280 941 T3

De acuerdo con la presente invención, el MESNA se administrará en una cantidad eficaz, es decir una cantidad suficiente para lograr el efecto antiviral profiláctico o terapéutico deseado.

5 La cantidad de MESNA necesaria para obtener el efecto antiviral deseado dependerá de una serie de factores, como el tipo de enfermedad, la vía de administración y el estado del paciente. Como regla, una dosis diaria típica variará entre 5 mg/kg y 60 mg/kg, administrados como una dosis unitaria única o como dosis repetidas separadas.

10 El MESNA se formulará en combinación con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables. De acuerdo con la presente invención, las preparaciones farmacéuticas o veterinarias que contengan MESNA estarán en presentaciones adecuadas para la administración oral, sublingual, bucal, parenteral, rectal, tópica, intranasal, inhalatoria y transdérmica.

15 Los ejemplos de formas farmacéuticas para administración oral, sublingual y bucal comprenden los comprimidos, las cápsulas, las pastillas recubiertas con azúcar, las tabletas, los polvos, los gránulos, las soluciones, las suspensiones y las emulsiones. Los ejemplos de formas farmacéuticas para administración parenteral comprenden las soluciones y emulsiones estériles para inyección (por ejemplo subcutánea, intramuscular, o intravenosa). Los ejemplos de formas farmacéuticas para administración rectal son los supositorios. Los ejemplos de formas farmacéuticas para administración intranasal e inhalatoria comprenden los líquidos pulverizables, los aerosoles, los nebulizadores y los inhaladores presurizados dosificados.

20 Se prefieren particularmente las formas farmacéuticas tópicas para la parte superior del tracto aerodigestivo, por ejemplo las formas tópicas nasales, faríngeas, rinofaríngeas y orofaríngeas, como los colutorios, gargarismos y enjuagues bucales.

25 Las preparaciones farmacéuticas que contienen MESNA también pueden contener otros principios fisiológicamente activos.

30 Las formas farmacéuticas se prepararán según las técnicas farmacéuticas convencionales, usando excipientes adecuados y excipientes como diluyentes, conservantes, antioxidantes, saborizantes, espesantes, agentes de isotonicidad, soluciones amortiguadoras, tensioactivos, saborizantes y similares.

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 280 941 T3

## REIVINDICACIONES

5 1. El uso del 2-mercaptoetanosulfonato sódico para la elaboración de una preparación farmacéutica para el tratamiento y la prevención de las infecciones por el virus de la gripe.

2. El uso que se reivindica en la reivindicación 1, donde la preparación es para administración tópica por vía nasal, faríngea, rinofaríngea u orofaríngea.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65