

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2008.08.22	(73) Titular(es): MARINOMED BIOTECHNOLOGIE GMBH VETERINÄRPLATZ 1 GEBÄUDE HA/3/STG. 3 1210 VIENNA AT
(30) Prioridade(s): 2007.08.24 US 935668 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2010.04.28	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.03.27 104/2013	(72) Inventor(es): ANDREAS GRASSAUER AT EVA PRIESCHL-GRASSAUER AT
	(74) Mandatário: MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA RUA DOS BACALHOEIROS, Nº 4 1100-070 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÃO ANTIVIRAL COMPREENDENDO UM POLISSACARÍDEO SULFATADO: IOTA-CARRAGENINA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA A UTILIZAÇÃO DE IOTA-E/OU KAPA-CARRAGENINA PARA O FABRICO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTI-VIRAL PARA A PROFILAXIA OU TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO PATOLÓGICA OU DOENÇA CAUSADA POR OU ASSOCIADA A UMA INFECÇÃO POR UM VÍRUS RESPIRATÓRIO SELECIONADO DE ENTRE O GRUPO CONSISTINDO EM ORTOMIXOVÍRUS, PARAMIXOVÍRUS, ADENOVÍRUS E CORONAVÍRUS. A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA AINDA A UTILIZAÇÃO DE FUCOIDANO, EM PARTICULAR DE ELEVADO PESO MOLECULAR FUCOIDANO, PARA O FABRICO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTI-VIRAL PARA A PROFILAXIA OU TRATAMENTO DE UMA CONDIÇÃO PATOLÓGICA OU DOENÇA CAUSADA POR OU ASSOCIADA A UMA INFECÇÃO POR UM VÍRUS RESPIRATÓRIO SELECIONADO DO GRUPO CONSISTINDO EM ORTOMIXOVÍRUS E PARAMIXOVÍRUS.

RESUMO

COMPOSIÇÃO ANTIVIRAL COMPREENDENDO UM POLISSACARÍDEO SULFATADO: IOTA-CARRAGENINA

A presente invenção proporciona a utilização de iota-e/ou kapa-carragenina para o fabrico de uma composição farmacêutica anti-viral para a profilaxia ou tratamento de uma condição patológica ou doença causada por ou associada a uma infecção por um vírus respiratório seleccionado de entre o grupo consistindo em ortomixovírus, paramixovírus, adenovírus e coronavírus. A presente invenção proporciona ainda a utilização de fucoidano, em particular de elevado peso molecular fucoidano, para o fabrico de uma composição farmacêutica anti-viral para a profilaxia ou tratamento de uma condição patológica ou doença causada por ou associada a uma infecção por um vírus respiratório seleccionado do grupo consistindo em ortomixovírus e paramixovírus.

DESCRIÇÃO

COMPOSIÇÃO ANTIVIRAL COMPREENDENDO UM POLISSACARÍDEO

SULFATADO: IOTA-CARRAGENINA

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção refere-se a iota-carragenina e composições farmacêuticas feitas do mesmo, em que o referido iota-carragenina está presente como ingrediente activo antiviral, para utilização médica ou veterinária para a prevenção ou tratamento de doenças causadas por ou associadas a um vírus que entra no corpo de um indivíduo através do trato respiratório, o vírus pode ser seleccionado a partir do grupo do vírus A da gripe humana, paramyxoviridae e adenoviridae.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Orthomyxoviridae são vírus de ARN, sendo os membros mais proeminentes espécies de vírus da gripe. Vírus influenza A e B são os dois tipos de vírus da gripe que causam a epidemia da doença humana. Eles são tipicamente transmitidos de pessoa para pessoa, principalmente por meio de transmissão de gotículas respiratórias.

A família paramyxoviridae inclui vírus sincicial respiratório (VSR), vírus parainfluenza e metapneumavirus. Infecções por vírus VSR e parainfluenza podem causar infecções respiratórias graves em lactentes e crianças jovens, mas também pode causar doença grave em idosos e adultos com comprometimento do sistema imunitário.

Entre as espécies de vírus parainfluenza humanos quatro membros são conhecidos por causar doenças respiratórias

graves em crianças para as quais atualmente não há prevenção ou tratamento eficaz disponível, os quatro membros, são os tipos de vírus parainfluenza 1 a 4. Acredita-se que os surtos de vírus parainfluenza e VSR contribuem substancialmente para o aumento das taxas de hospitalização e mortalidade. Os pacientes com sistema imunológico, cardíaco ou pulmonar debilitado encontram-se em maior risco de incorrer em complicações graves após uma infecção paramyxovirus e, portanto, beneficiariam particularmente de uma terapia antiviral.

O vírus sincicial respiratório (VSR), que é o patógeno respiratório mais difundido tipicamente aflige os indivíduos durante a infância e a primeira infância em todo o mundo, provoca surtos anuais de pneumonia e bronquiolite durante o inverno e no início da primavera. Bronquiolite e pneumonia VSR implicam hospitalização de centenas de milhares de crianças todos os anos. Protecção passiva contra o VSR encontra-se disponível, pelo menos em parte, a uma taxa de sucesso de 55% mediante injeção intramuscular mensal do anticorpo monoclonal humanizado anti-VSR palivizumab (Synagis®).

A família coronaviridae inclui coronavírus e torovírus. Os coronavírus são conhecidos por infectarem o tracto respiratório superior e o tracto gastrointestinal em mamíferos e aves. Acredita-se que os coronavírus causam uma elevada percentagem de todas as constipações comuns em adultos humanos.

Adenoviridae são vírus ADN que tipicamente infectam o tracto respiratório superior. Neste momento, mais de 50 serotipos de adenovírus humano diferentes são conhecidos, agrupados em seis subtipos de A a F, os quais são

responsáveis por 5-10% de uma infecção respiratória superior em crianças.

Tendo em vista o acima mencionado, acredita-se que existe uma forte necessidade de uma composição farmacêutica antiviral potente de fácil aplicação e eficaz na prevenção ou no tratamento de infecções virais respiratórias causadas por membros das famílias paramyxoviridae, orthomyxoviridae, coronaviridae e/ou adenoviridae.

Polissacarídeos sulfatados incluindo carrageninas e fucoidano têm sido conhecidos pela sua eficácia antiviral ao longo de décadas. Consequentemente, a técnica anterior está repleta de artigos científicos sobre os efeitos antivirais de carrageninas. Num comentário mais relevante, Gonzalez M.E. et al. (1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31, 1388-1393) relata uma eficácia antiviral de diferentes sulfatados polissacarídeos, incluindo iota-carragenina contra vários vírus de animais. Iota-carragenina mostrou actividade antiviral contra os vírus com **invólucro** HSV-1, HSV-2, vírus da floresta de Semliki (SFV), vírus vaccinia e vírus da peste suína Africana (ASF) e contra o vírus **nu** encefalomiocardite (EMC). Iota-carragenina não tinha qualquer efeito sobre os vírus encapsulados de vírus de estomatite vesicular (VEV) e vírus do sarampo e encapsulados do vírus da pólio vírus tipo 1 e adenovírus tipo 5.

A Patente EUA 4.783.446 revela uma actividade antiviral de iota-, kappa e lambda-carragenina contra infecção retroviral, em particular, contra células T humanas do vírus da leucemia (HTLV) infecção III.

O documento WO 88/06396 descreve um método para o tratamento de infecções retrovirais, incluindo a infecção com o VIH por administração de um carragenina ou uma mistura de carrageninas.

Girond et al. (1991, Research Virol. 142, 261-270) revela que os polissacarídeos sulfatados como iota-, kappa- e lambda-carragenina tem uma actividade inibidora eficaz contra a replicação do vírus da hepatite A (VHA).

Baba M. et al. (1988, Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1742-1745) apresenta vários polissacarídeos sulfatados, incluindo sulfato de dextrano, pentosano polissulfato, fucoidano e carragenina como potentes inibidores de HSV-1, HSV-2, citomegalovírus humano (CMV), o vírus da estomatite vesicular (VEV), o vírus Sindbis e VIH-1. Por outro lado, estes polissacarídeos sulfatados foram testados para permanecerem inativos contra vírus de coxsackie, poliovírus e o vírus parainfluenza.

A EP 0293826 descreve a aplicação de tratamento terapêutico e profilático de polissacarídeos sulfatados tais como o fucoidano e carrageninas para inibir o VIH-1 *in vitro*.

A Patente EUA 5.658.893 descreve um método para inibir infecção de células humanas por rotavírus em contato do rotavírus com lambda-carragenina. É ainda revelado que iota- e kappa-carragenina não exibiram atividade anti-rotaviral.

A EUA 2003/181415 A descreve que os polissacarídeos sulfatados, incluindo o sulfato de celulose, são conhecidos como sendo eficazes contra vários vírus com envelope e, em

particular, contra o vírus herpes simplex (HSV), vírus de papiloma e VIH.

A JP 11080003 A descreve a utilização de polissacarídeos sulfatados, como por exemplo, carragenina para o tratamento de várias infecções virais e bacterianas, incluindo infecções causadas pelo vírus influenza, em humanos, animais de quinta e animais domésticos.

O fucoidano é um polissacarídeo sulfatado extraído principalmente a partir de várias espécies de algas castanhas. Existem dois tipos de grau farmacológico de fucoidanos disponíveis no mercado, um fucoidano de elevado peso molecular (HMWF) tendo uma fracção um peso molecular médio que varia entre cerca de 1.000.000 a 2.000.000 Da (por exemplo Kraeber, Alemanha) e um fucoidano peso de molecular baixo (LMWF) tendo uma fracção um peso molecular médio de 8200 DA. F-fucoidano é composto principalmente por ésteres sulfatados de fucose, enquanto U-fucoidano é composto por cerca de 20% de ácido glucurónico.

Carragenina é um termo genérico para polissacarídeos sulfatados à base de galactose, extraído de algas (Rhodophyceae). É utilizado principalmente como um agente espessante, gelificante, estabilizante ou emulsionante em produtos farmacêuticos e alimentares. Existem mais de 10 carrageninas estruturalmente diferentes, a sua natureza, dependendo do género de algas marinhas a partir das quais são extraídas. Os três principais tipos são iota-, kappa- e lambda-carragenina, que diferem ligeiramente na sua estrutura e no grau de sulfatação. Iota-carragenina é um gel suave formando galactano sulfatado predominantemente extraído de algas vermelhas *Gigartina stellata* e *Chondrus crispus*. Kappa-carragenina produz, géis rígidos fortes e é

predominantemente produzido a partir de *Kappaphycus cottonii*. Lambda-carragenina, que é a forma mais comum, é frequentemente usada para engrossar produtos lácteos.

Apesar da longa actividade antiviral conhecida dos carrageninas, contra vírus, tais como, por exemplo, VIH, HSV, VHA, HTLV, ou HPV, o mecanismo de como carrageninas exibem actividade antiviral ainda necessita de mais esclarecimentos.

Por exemplo, Baba M. et al. (1988, *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1742-1745) especula que os polissacarídeos sulfatados incluindo kappa- e lambda-carragenina inibem ou pelo menos contribuem para a inibição da absorção do vírus de diversos vírus com envelope à superfície da célula hospedeira. Do mesmo modo, EUA 2005/0261240 assume que carragenina pode não se ligar especificamente a um vírus bloqueando assim sítios receptores de vírus. Damonte E.B. et al. (2004, *Curr. Med. Chem.* 11, 2399-2419) divulga que os polissacarídeos sulfatados podem imitar o sulfato de heparina celular e, portanto, bloquear os receptores virais responsáveis pela interação inicial entre vírus e célula hospedeira, enquanto Gonzalez M.E. et al. (1987, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1388-1393) descobriram, utilizando partículas de viriões marcadas, que viriões HSV-1 são internalizados, mesmo na presença de elevadas concentrações de iota-carragenina. Eles sugerem que, pelo menos, para o HSV-1 a carragenina inibe um passo para a replicação do vírus após a fixação e a entrada do vírus na célula, mas ainda antes de a síntese de proteínas virais tardias.

Turner E.V. e Sonnenfeld G. (1979, *Infection and Immunity* 25, 467-469) divulga uma actividade antiviral de lambda, mas

não de kappa-carragenina contra o vírus da estomatite vesicular bovina cuja atividade antiviral deve-se à imunomodulação, ou seja, à indução do interferão.

Em conclusão, pode-se resumir considerando as palavras da EUA 5.658.893, que *"tendo em conta as diferentes respostas por diferentes vírus a polissacarídeos sulfatados, é claro que a resposta de um determinado vírus de carragenina não pode ser prevista com certeza, sem experimentação. O mecanismo pelo qual os polissacarídeos sulfatados, em particular os carrageninas, inibem a replicação viral e infecciosidade pode não ser uniforme como diferentes investigadores relataram resultados contraditórios quando se trabalha com diferentes vírus e diferentes tipos de células. Não seria evidente para um perito na técnica que uma substância, tal como um polissacárido sulfatado que é um inibidor eficaz de um vírus que demonstra eficácia semelhante contra um outro vírus.*

Tendo em conta o acima exposto, a presente invenção fornece agora uma composição anti-viral baseada em carragenina adequado para o tratamento profilático ou terapêutico de infecções virais respiratórias causadas por membros das famílias Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae e/ou Adenoviridae. Ao contrário da divulgação de Fujisawa H. et al. (1987, J. gen. Virol. 68, 425-423), que relata que a administração intranasal de carragenina não reduziu a titulação do vírus da gripe A em murganhos, mas pelo contrário até aumento a susceptibilidade dos animais ao vírus dependendo da quantidade de vírus utilizada para a infecção, verificou-se agora, surpreendentemente, que o carragenina, e em especial iota- e kappa-carragenina, têm de facto eficácia antiviral contra vários membros de

orthomyxoviridae, paramyxoviridae, adenoviridae e coronaviridae.

Além disso, verificou-se surpreendentemente que o fucoidano, particularmente a fracção de elevado peso molecular fucoidano (HWMF), tem uma eficácia antiviral contra vários membros da orthomyxoviridae e paramyxoviridae.

Por conseguinte, a presente invenção tem como objectivo proporcionar uma composição farmacêutica anti-viral apropriada para a prevenção ou o tratamento de infecções do tracto respiratório causadas por um vírus seleccionado de entr o grupo consistindo em ortomixovírus, paramixovírus e adenovírus, bem como para doenças ou condições patológicas associadas com tais infecções virais primárias, tais doenças ou condições que incluem infecções virais ou bacterianas secundárias, assim como sintomas físicos tipicamente associados com qualquer infecção, tais como primárias ou secundárias, incluindo sintomas tais como febre, dor, tonturas, tremores, transpiração, e/ou desidratação.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Numa primeira forma de realização da presente invenção refere-se ao uso de carragenina como um ingrediente antiviral activo no fabrico de uma composição farmacêutica para a profilaxia ou tratamento de uma condição patológica ou doença causada por ou associada a uma infecção por um vírus respiratório, em que o referido vírus respiratório compreende pelo menos uma proteína ligada a ou integrada na membrana viral, a proteína é capaz de se ligar a uma célula hospedeira através de um receptor que possui pelo menos uma

porção de açúcar, sendo o vírus respiratório seleccionado a partir do grupo consistindo num vírus da gripe humana A e paramixovírus e o carragenina sendo iota e opcionalmente, kapa-carragenina.

Uma "célula hospedeira" aqui referida é uma célula eucariótica, que é, naturalmente, isto é, sob condições naturais, ou naturais, como, orientada e penetrada por qualquer um dos vírus aqui referidos adiante. Para fins experimentais e laboratoriais que é o estado da técnica a utilização de linhas de células hospedeiras que são geralmente reconhecidos como sendo adequadas em modelos in vitro para testar a eficácia de agentes fisiologicamente activos e que permitem, pelo menos, alguma previsibilidade dos resultados no que diz respeito à aplicação em seres humanos comparáveis.

A presente invenção diz ainda respeito a uma composição farmacêutica compreendendo iota- e, opcionalmente kappa-carragenina como um ingrediente activo antiviral e para aplicações destes na prevenção ou no tratamento de doenças causadas por ou associadas a um vírus que entra no corpo de um indivíduo através do tracto respiratório, sendo o referido vírus composto por pelo menos uma proteína ligada a ou integrada na sua membrana viral, a proteína capaz de se ligar a uma célula hospedeira através de um receptor que possui pelo menos uma porção de açúcar, e o vírus ser seleccionado entre o grupo consistindo no vírus da gripe humana A e paramixovírus.

O termo "ingrediente activo antiviral", tal como aqui utilizado refere-se a um composto que é directa ou indirectamente eficaz em interferir especificamente com pelo menos uma acção viral seleccionada do grupo

consistindo na penetração do vírus de células eucarióticas, replicação do vírus em células eucarióticas, montagem do vírus, a libertação de vírus a partir de células eucarióticas infectadas, ou que seja eficaz na inibição não específica um aumento da titulação do vírus, ou não específica redução de nível de título do vírus num sistema hospedeiro eucariota ou de mamífero. Também se refere a um composto que impede ou reduz a probabilidade de obtenção de uma infecção viral.

A presente composição farmacêutica pode ser administrada, como seja o caso, antes ou após o aparecimento de uma infecção viral, isto é, para fins de tratamento profilático ou terapêutico, ou para administração profilática e terapêutica

O termo "profilaxia" ou "tratamento preventivo", tal como aqui utilizado refere-se à administração da presente composição farmacêutica a um indivíduo saudável, a fim de reduzir a susceptibilidade do referido indivíduo a uma infecção viral.

O termo "terapia" ou "tratamento terapêutico", tal como aqui utilizado refere-se à administração da presente composição farmacêutica a fim de alcançar uma redução na gravidade e/ou a frequência dos sintomas, a eliminação de sintomas e/ou causa subjacente, prevenção da ocorrência de sintomas e/ou a sua causa subjacente, e/ou melhoria ou reparação de danos diretamente ou indiretamente causados associados, por exemplo, através de infecção secundária, com a infecção viral.

É sabido que orthomyxo- e paramixovirus e vários outros vírus anexam à célula hospedeira através da ligação a

receptores presentes na superfície da célula hospedeira, os receptores sendo tipicamente glicoproteínas ou glicolípidos contendo resíduos de açúcar, incluindo o ácido siálico (ácido N-acetil-neuramico) e resíduos de sulfato de heparano.

No caso de, orthomyxovirus, por exemplo, vírus da gripe, os viriões ligam a resíduos de ácido siálico. Os vírus influenza humanos ligam preferencialmente aos resíduos de ácido siálico possuindo uma ligação alfa 2-6, enquanto o vírus da gripe aviária preferencialmente ligam a resíduos de ácido siálico possuindo ligação alfa 2-3.

A incorporação celular de um paramixovírus envolve, pelo menos, duas das suas glicoproteínas de membrana integrais. Uma delas, tipicamente seleccionados de entre o grupo de glicoproteínas HN, H e G que está envolvido na adesão celular e a outra glicoproteína, ou seja, à glicoproteína F, está envolvida na mediação independente do pH de fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. Por exemplo, respirovirus e rubulavirus ligam a resíduos de ácido siálico de glicoproteínas ou receptores de células hospedeiras glicolípidas.

A ligação do VSR não é totalmente compreendida, mas a fixação da célula hospedeira provavelmente envolve interacção com sulfato de heparano, um glicoseaminoglicano que faz parte da matriz extracelular.

Além de revelar a presente invenção, observou-se in vitro que a exposição das células hospedeiras a carragenina, ao iota- em particular e/ou ao kappa-carragenina, podem alterar a estrutura da superfície celular de uma referida célula hospedeira, presumivelmente causando alterações

conformacionais na estrutura tridimensional de certos receptores de superfície celular ou através de mascaramento e/ou modificando os referidos receptores.

Surpreendentemente, esta alteração na superfície da célula hospedeira impedido orthomyxo- e paramixovírus de se fixarem às células hospedeiras, mesmo após a remoção do carragenina partir das células hospedeiras, ou seja, na ausência de carragenina no momento de artificialmente desencadear uma infecção por inoculação in vitro.

Este efeito antiviral específico de carragenina foi observado desde que foi iniciada a infecção desencadeada artificialmente o mais tardar cerca de duas horas após a remoção do polímero a partir das células hospedeiras, o que indica um efeito duradouro relativamente longo das mudanças estruturais na superfície da célula causado pela interacção com carragenina.

Em contraste com paramyxo- e ortomixovírus, um efeito protector, na ausência de carragenino no momento do desencadeamento da infecção não foi observado em outros vírus, incluindo rinovírus e coronavírus, enquanto que a protecção foi apenas conseguida na presença de carragenina.

Assim sendo, e tendo em vista a eficácia antiviral comprovada experimentalmente de carragenino contra a infecção por rinovirus, conclui-se que com os rinovírus e provavelmente com outros vírus, também, o efeito antiviral pode ser devido à ligação do polímero carragenino aos viriões ao invés de interacção química ou física do polímero com os receptores das células hospedeiras.

Tal como aqui mencionado antes, as composições de carragenina da presente invenção podem ser aplicadas com êxito contra a infecção pelo vírus da gripe A, em que o referido vírus da gripe A é um vírus humano que se liga a uma célula hospedeira através de ligação de ácido siálico 2-6. A influenza humana A de infecções por vírus é melhor tratada usando predominantemente ou exclusivamente iota-carragenina como o ingrediente activo antiviral.

Verificou que as espécies paramixovírus que são susceptíveis ao tratamento por iota-carragenina são seleccionadas a partir do grupo constituído por vírus parainfluenza humano (HPV) tipo 1, HPV tipo 2, HPV tipo 3, HPV tipo 4 e VSR.

Os estados patológicos ou doenças aqui referidas em ligação com a administração profilática ou terapêutica de iota-carragenina incluem bronquite aguda, bronquite crónica, rinite, sinusite, laringite, bronquiolite aguda, faringite, amigdalite, laringite, traqueíte, asma e pneumonia. A carragenina é especialmente adequada para aplicação tópica para tratar a inflamação da pele ou da mucosa. Carragenina útil para aplicação tópica na pele ou mucosa, de acordo com a presente invenção tem um peso molecular variando entre cerca de 15.000 e 5.000.000 Da, fracções com pesos moleculares médios superiores a 50.000 Da, e especialmente as fracções com pesos moleculares médios no intervalo de 50.000 e 3.000.000 Da sendo particularmente preferido.

Por exemplo, administração sistémica, parentérica ou oral, é possível, também, especialmente utilizando polímeros de peso molecular inferior que têm um peso molecular médio na gama de 15.000 a 100.000 Da.

A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção ajustada para utilização parentérica pode ser fornecida como uma preparação seleccionada do grupo de loções para a pele, cremes, pomadas, geles, pós, incluindo pós para inalação, sprays, espumas, gotas de líquidos ou soluções de gargarejo. As preparações de iota-carragenina podem, no entanto, também ser ajustadas para a administração oral, por exemplo, como soluções líquidas, ou preparações semi-sólidas ou sólidas, tais como pós secos, comprimidos, cápsulas, drageias ou qualquer outra forma galénica oralmente ingerível. As composições farmacêuticas para aplicação na mucosa incluem sprays nasais ou gotas e qualquer outro sistema de entrega de medicamentos nasais conhecidos na técnica tais como descritos, por exemplo, na EUA 6.391.452.

Quando a composição é para aplicação tópica e é um líquido ou semi-sólido que compreende, tipicamente, na sua forma pronta para uso iota-carragenina numa quantidade de entre 0,01 e 10%, de preferência entre 0,01 e 5%, mais preferencialmente entre 0,1 e 2% em peso, em relação ao volume total da composição. Quando a composição é sólida que compreende, tipicamente, na sua forma de pronto a utilizar iota-carragenina numa quantidade de entre 0,01 e 10%, de preferência entre 0,01 e 5%, mais preferencialmente entre 0,1 e 2% em peso em relação ao peso total da composição.

Os carrageninas úteis na presente invenção estão disponíveis comercialmente, mas podem também ser preparados por extracção a partir de plantas da alga de extracção de acordo com os procedimentos conhecidos na técnica.

Se não for indicado de outra forma, o termo "carragenina", tal como aqui utilizado refere-se a iota- e opcionalmente kappa-carragenina.

O carragenina da presente invenção pode ainda ser um homopolímero ou de um heteropolímero. Um homopolímero de iota-carragenina é construído de subunidades de apenas iota-carragenan, ao passo que um heteropolímero carragenina compreende subunidades de iota- e kappa-carragenina.

O termo "mistura" dos carrageninas podem, assim, também se referem a uma composição de matéria compreendendo uma mistura de diferentes subunidades de carragenina, como parte de, pelo menos, um carragenina heteropolimérico presente na referida composição.

Tipicamente, as composições farmacêuticas antivirais de acordo com a presente invenção são substancialmente livres de outros que kappa-carrageenan e iota-carrageninas.

Para algumas aplicações, a composição é substancialmente composta exclusivamente de iota-carragenina, enquanto para outras aplicações, a composição pode compreender mais do que 50%, preferencialmente mais do que 70%, e, especialmente, até mais de 95% (w/w), em peso seco, de iota-carragenina, em relação ao peso seco total de todos os carrageninas presentes na composição.

Quando a composição compreende pelo menos um dos valores numéricos de carragenina heteropolimérica indicados acima referem-se as percentagens das respectivas subunidades de carragenina.

As composições carragenina antivirais em conformidade com a presente invenção podem ainda compreender pelo menos um veículo farmacêuticamente aceitável e/ou aditivos adequados e permitidos para utilização médica.

O veículo pode ser um diluente, por exemplo, água, soro fisiológico, facultativamente tamponada com fosfato (PBS), um excipiente, ou um outro veículo que facilita a administração da composição. Quando a composição é sólida, semi-sólida ou líquida os grupos de veículos e aditivos, respectivamente, podem incluir, mas não estão limitados a SiO_2 , TiO_2 , um aglutinante tal como celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, gelatina, amido, lactose, mono-hidrato de lactose, ácido algínico ou amido de milho, um lubrificante ou agente tensioactivo, como o estearato de magnésio ou lauril sulfato de sódio, um agente deslizante como por exemplo dióxido de silício coloidal, um agente edulcorante tal como a sacarose ou a sacarina.

Ainda mais aditivos podem ser seleccionados a partir do grupo consistindo em conservantes fisiologicamente aceitáveis, os sais de metais alcalinos farmacêuticamente aceitáveis, tais como sódio, potássio, lítio ou amónio, cloretos, tampões ou agentes de ajuste de pH, tais como ácido cítrico, ácido acético, ácido fumárico, ácido clorídrico, ácido málico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido sulfúrico e ácido tartárico, e combinações dos referidos ácidos.

Para muitas aplicações, é conveniente que a composição compreenda cloreto de sódio como um aditivo.

Tipicamente, um sal farmacêuticamente aceitável está presente na composição numa quantidade não superior a 1%, de preferência não mais do que 0,6% (w/v).

Nas composições de acordo com a presente invenção o próprio iota-carragenina pode estar, também, presente como um sal, de preferência, como um sal de sódio.

É preferível que as presentes composições para aplicação profiláctica ou terapêutica médica sejam fornecidas como preparações estéreis, livres de germes, isentas de agentes patogénicos, isentas de pirogénio e/ou antialérgicos.

A carragenina foi considerada não-tóxica por administração oral ou por via cutânea, ou mediante inalação, mesmo quando aplicado em doses extremamente elevadas. Foi, portanto, classificada como "geralmente reconhecido como segura" (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA).

Iota-carragenina pode também ser usado como um agente antiviral eficaz contra infecções de ortomixovírus e paramixovírus em vários medicamentos, juntamente com outros compostos fisiologicamente activos ou medicamentos como principais ingredientes activos, em que o papel de iota-carragenina inclui o seu uso como um transportador ou como um aditivo tal como um agente emulsionante ou um agente de modificação de viscosidade. É compatível com a maior parte das preparações farmacêuticas, sem causar efeitos colaterais indesejáveis.

É portanto dentro do âmbito da presente invenção proporcionar composições farmacêuticas compreendendo iota-carragenina, como aditivo, mais especificamente, como um antiviral, particularmente anti-paramyxoviral ou vírus

influenza A anti-humano um vírus eficaz, adjuvante de medicamentos que são tipicamente aplicadas na profilaxia ou terapia de doenças infecciosas e/ou inflamatórias, alergias e/ou condições de um sistema imunológico debilitado ou suprimido. Em particular, está dentro do âmbito da presente invenção usar iota-carragenina como um vírus adjuvante eficaz anti-influenza em combinação com medicamentos úteis na profilaxia ou terapia de doenças infecciosas e/ou inflamatórias, alergias e/ou as condições de um sistema imunitário débil ou suprimido.

Observou-se que também carragenina pode ter actividade imuno-moduladora, em particular actividade de fortalecimento do sistema imunológica. Ainda não está claro, porém, se essa atividade está diretamente associada a uma interferência fisiológica da substância ou indiretamente, por meio de sua eficácia antiviral.

A composição da presente invenção irá geralmente ser formulada em preparações para utilização tópica ou mucosa, de preferência, seleccionado a partir de pulverizadores, particularmente sprays nasais, pós, gotas, soluções de gargarejo, espumas, géis, cremes, pomadas, loções, pastilhas, e semelhantes. No entanto, a composição farmacêutica da presente invenção também podem ser usada para revestir superfícies sólidas de higiene ou de artigos sanitários, tais como, por exemplo, artigos de higiene facial ou saneamento, que são normalmente utilizados nas áreas oral e/ou nasal, incluindo, mas não limitado a nasal tecidos ou papéis, e lenços.

Mais especificamente, a composição farmacêutica pode ser aplicada, por exemplo, pulverizada - bem como desinfectantes - em luvas, tecidos ou artigos de higiene,

incluindo tecidos nasais ou dos artigos, a fim de exercer um efeito virucida, pelo menos, em certa medida, contribuindo assim para a redução num indivíduo de auto-infecção repetida por mãos contaminadas e também para reduzir a distribuição viral entre os diferentes indivíduos que estão em estreito, contacto um com o outro, por exemplo, mãos dadas.

Outros artigos revestidos, impregnados ou embebidos com uma composição farmacêutica numa base iota-carragenina compreende cotonetes, máscaras de pó ou máscaras faciais médicas ou sanitárias. Mesmo batons podem ser formulados para conter uma quantidade eficaz antiviral de iota-carragenina. Estes artigos de higiene e saneamento podem ser usados profilaticamente ou para o tratamento terapêutico contra uma infecção viral e podem ser úteis na prevenção ou redução de um risco de infecção.

É um objectivo da presente invenção fornecer composições antivirais à base de carragenina para o tratamento profiláctico ou terapêutico de indivíduos particularmente sensíveis a ou ao risco aumentado de infecção de orthomyxo ou paramixovírus, incluindo pacientes de alto risco, seleccionados de entre o grupo consistindo nos pacientes DPOC, pacientes asmáticos, pessoas que sofrem de alergias, ou a partir de sistemas imunológicos debilitados, cardíaco ou sistemas pulmonares e pacientes transplantados.

Em conformidade com a presente invenção, iota-carragenina, também pode ser utilizado como um ingrediente activo antiviral no fabrico de uma composição farmacêutica para a profilaxia ou o tratamento terapêutico de uma condição patológica ou doença causada por, ou associada a uma

infecção por um vírus respiratório ser um adenovírus, o adenovírus ser de preferência adenovírus tipo B (Ad50).

Infecções por adenovírus são melhor tratadas com composições onde iota-carragenina é o único ou predominante ingrediente antiviral ativo.

Estudos experimentais confirmaram ainda que o fucoidano também é utilmente aplicado como um ingrediente activo antiviral no fabrico de uma composição farmacêutica eficaz para a profilaxia ou tratamento de estados patológicos ou de doenças causadas por ou associadas com uma infecção do vírus respiratório, o vírus respiratório seleccionado a partir do grupo consistindo em orthomyxo- e paramixovírus. Neste contexto, o orthmyxovirus é normalmente o vírus da gripe A ou B, e o paramixovírus é tipicamente VSR.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Fig. 1 mostra a eficácia de iota-carragenina na redução da formação de placas do vírus da gripe A H1N1/Chile/1/93 em células MDCK em diferentes doses que variam de uma concentração final de 0,1 a 100 µg/ml. Ordenada = percentagem da formação de placas após a infecção de células MDCK com a suspensão do vírus da gripe A H1N/Chile/1/93, contendo diferentes concentrações de iota-carragenina em relação à formação de placa de células MDCK infectadas com a suspensão do vírus influenza A H1N1/Chile/1/93 sem iota-carragenina (estabelecido como 100%);

abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão de vírus em $\mu\text{g/ml}$.

A Fig. 2 mostra a eficácia de iota-carragenina na redução de formação de placas de vírus da gripe A H3N2/Aichi2/68 em células MDCK em diferentes doses que variam entre uma concentração final de 75 a 300 $\mu\text{g/ml}$. Ordenada = percentagem de formação de placas após a infecção de células MDCK com a suspensão do vírus da gripe A H3N2/Aichi2/68 contendo diferentes concentrações de iota-carragenina em relação à formação de placa de células MDCK infectadas com a suspensão do vírus da gripe A H3N2/Aichi2/68 sem iota-carragenina (estabelecida como 100%); abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão de vírus em $\mu\text{g/ml}$.

A Fig. 3 mostra a eficácia de iota-carragenina na redução da formação de placas de vírus parainfluenza 3 em células Hep-2 em diferentes doses que variam de uma concentração final entre 0,1 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Ordenada = percentagem da formação de placas após infecção de células Hep-2 com a suspensão do vírus parainfluenza 3, contendo diferentes concentrações de iota-carragenina em relação à formação de placas de células Hep-2 infectadas com a suspensão de vírus parainfluenza 3 sem iota-carrageenan (estabelecida como 100%); abcissas =

diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão de vírus em $\mu\text{g/ml}$.

A Fig. 4

mostra a eficácia do pré-tratamento de iota-carragenina na redução da formação de placas de vírus parainfluenza 3 em células HeLa em diferentes doses que variam entre uma concentração final de 13 a 400 $\mu\text{g/ml}$.

Ordenada = percentagem de formação de placas após a infecção de células HeLa, pré-tratadas (pré-incubação) durante 3 h com o iota-carragenina, e subsequente remoção do polímero) com suspensão de vírus parainfluenza 3 em relação à formação de placas de células HeLa não tratados (sem pré-incubação de iota-carragenina) (definido como 100%); abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina no meio de pré-incubação em $\mu\text{g/ml}$. C = células pré-incubadas com o polímero carboximetilcelulose (controlo negativo).

A Fig. 5

mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por coronavírus em células de rim de gato (CK).

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de carragenina na suspensão de vírus (Fig.5A) ou no meio de pré-incubação (Fig.5B) em $\mu\text{g/m}$; Fig.5A = células infectadas com o coronavírus felino navirus FIP na presença de iota-, kappa- ou lambda-carragenina;

Fig.5B = células pré-incubadas durante 3 h com iota-, kappa- e lambda-carragenina, subsequentemente lavadas três vezes com PBS e infectadas com coronavírus felino FIP na ausência do polímero.

A Fig. 6 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por HRV8 em células HeLa.

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão de vírus (Fig. 6A) ou no meio de pré-incubação (Fig.6B), em µg/ml; Fig.6A = células infectadas com o rinovírus humano tipo 8 (HRV8) na presença de iota-carrageenan; Fig.6B = células pré-incubadas durante 3 h com o iota-carragenina, subsequentemente lavadas três vezes com PBS e infectados com HRV8 na ausência de iota-carragenina.

A Fig.7 mostra a ligação de iota-carragenina marcada com FITC às células HeLa após lavagens sucessivas com PBS.

Ordenada = cálculo do iota-carragenina em µg/ml (convertido a partir de unidades de luz fluorescente em µg/ml, utilizando uma curva padrão); abcissas = passos de lavagem das células com PBS; 0 = iota-carragenina marcado com FITC contendo sobrenadante foi removido das células; 1 = primeira etapa de lavagem das células com PBS, 2 = segunda

etapa de lavagem das células com PBS, 3 = terceira etapa de lavagem das células com PBS.

A Fig. 8 mostra os resultados de uma experiência de inibição de morte celular induzida por VSR em células Vero.

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão de vírus (barras escuras) ou ao meio de pré-incubação (barras claras), em $\mu\text{g/ml}$; barras escuras = células infectadas com VSR na presença de iota-carragenina; barras claras = células pré-incubadas durante 3 h com o iota-carragenina, subsequentemente lavadas três vezes com PBS e infectados com VSR na ausência de iota-carragenina.

Fig.9 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por VSR em células HNep.

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção e 5 dias de incubação em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = pontos de tempo para a adição de iota-carragenina numa concentração final de $100 \mu\text{g/ml}$ e o meio de incubação (horas pós infecção).

Fig.10 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por VSR em células HNep.

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção e 5 dias de incubação em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão de vírus em µg/ml.

Fig. 11 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por VSR em células HNep.

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção e 6 dias de incubação a 37 °C em relação às células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-, kappa ou lambda-carragenina na suspensão de vírus em µg/ml.

Fig. 12 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por VSR em células HNep.

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina (barras escuras) e fucoidano (barras claras) na suspensão de vírus em µg/ml.

Fig. 13 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por vírus parainfluenza 3 em células HNep.

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-, kappa- e lambda-carragenina ou fucoidano na suspensão de vírus em $\mu\text{g/ml}$.

FIG. 14 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por vírus influenza H3N2 (gripe) em células HNep.

Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-, kappa- e lambda-carragenina ou fucoidano na suspensão de vírus em $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 15 mostra a eficácia de iota-, kappa, lambda-carragenina e fucoidano na redução da formação de placa do vírus influenza A H5N1 em células MDCK em doses de 400 $\mu\text{g/ml}$ e 44 $\mu\text{g/ml}$.

Ordenada = percentagem de formação de placas após a infecção de células MDCK com a suspensão de vírus da gripe aviária H5N1 contendo diferentes concentrações de iota-, kappa, lambda-carragenina ou fucoidano em relação à formação de placa de células MDCK infectadas com suspensão de vírus influenza H5N1 sem polímero (estabelecida como 100%); abcissas = diferentes concentrações finais

de iota-, kappa-, lambda-carragenina ou fucoidano na suspensão de vírus em µg/ml.

Fig. 16 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por adenovírus do tipo 50 (AD50) em células HNep. Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão de vírus em µg/ml.

Fig.17 mostra os resultados de um teste de inibição de morte celular induzida por Ad50 em células HNep. Ordenada = percentagem de células não infectadas após a infecção em relação a células de controlo não infectadas; abcissas = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão de vírus (barras escuras) ou no meio de pré-incubação (barras claras), em µg/ml; barras escuras = células infectadas com AD50 na presença de iota-carragenina; barras claras = células pré-incubadas durante 3 h com iota-carrageenan, subsequentemente lavadas três vezes com PBS e infectados com AD50 na ausência de iota-carragenina.

De modo a que a invenção aqui descrita possa ser mais plenamente compreendida, os seguintes exemplos são apresentados. Os exemplos são apenas para fins ilustrativos e não devem ser considerados como limitativos desta invenção em qualquer aspecto. É ainda entendido que o

presente invento inclui também as variações das formas de realização explicitamente descritas numa medida como seria contemplado por uma pessoa com conhecimentos correntes na técnica.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Efeito de diferentes concentrações de iota-carragenina na formação de placas de vírus influenza A em células MDCK.

As suspensões de vírus contendo 60-80 ufp de vírus influenza A H1N1/Chile/1/93 foram misturados com uma solução de stock de iota-carragenina às concentrações finais de 0,1, 1, 10, 25, 50 ou 100 µg/ml. As monocamadas confluentes da linhagem celular de rim canino MDCK em placas de seis alvéolos foram infectadas com as suspensões de vírus durante 60 minutos a 34°C. A infecção pelo inoculo foi removida e as células foram lavadas com PBS e a sobrecamada de agarose contendo 0,6% de agarose foi adicionada. As placas foram incubadas a 36°C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ em ar. 48-60 h após a infecção a sobrecamada de agarose foi removida, as células foram tingidas com tinta violeta cristal e placas visíveis foram contadas. A percentagem de formação de placas relativamente ao controlo infectado (sem tratamento de iota-carragenina) foi determinada para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 1, verificou-se que o iota-carragenina inibe, de uma forma dependente da dose, a formação de placas de vírus influenza A H1N1/Chile/1/93 em células MDCK. Uma redução de 50% no número de placas (IC₅₀) foi obtida a uma concentração de iota-carragenina de 50 µg/ml.

Exemplo 2: Efeito de diferentes concentrações de iota-carragenina na formação de placas do vírus influenza A em células MDCK.

Suspensões de vírus contendo 60-80 pfu de vírus influenza A H3N2/Aichi2/68 foram misturados com uma solução de reserva de iota-carragenina para concentrações finais de 75, 150 ou 300 µg/ml. As monocamadas confluentes da linhagem celular de rim canino MDCK em seis placas de alvéolos foram infectadas com suspensões de vírus durante 60 minutos a 34°C. A infecção pelo inoculo foi removida e as células foram lavadas com PBS e sobrecamada de agarose contendo 0,6% de agarose foi adicionada. As placas foram incubadas a 37° C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ em ar. 48-60 h após a infecção a sobrecamada de agarose foi removida, as células foram tingidas com tinta violeta cristal e as placas visíveis foram contadas. A percentagem de formação de placas relativamente ao controlo infectado (sem iota-carragenina) foi determinada para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 2, verificou-se que o iota-carragenina inibe, de uma forma dependente da dose, a formação de placas de vírus da gripe A H3N2/Aichi/2/68 em células MDCK.

Exemplo 3: Efeito de diferentes concentrações de iota-carragenina na formação de placa de vírus parainfluenza 3 em células Hep-2

As suspensões de vírus que contenham 60-80 pfu de vírus parainfluenza 3 foram misturadas com uma solução de reserva de iota-carragenina às concentrações finais de 0,1, 1, 10, 25, 50 e 100 µg/ml. A mistura foi incubada durante 1 hora a

34°C. As monocamadas confluentes de células Hep-2 em placas de seis alvéolos foram infectadas com as suspensões de vírus, durante 60 minutos a 34°C. A infecção pelo inoculo foi removida e as células foram lavadas com PBS e sobrecamada de agarose contendo 0,6% de agarose foi adicionado. As placas foram incubadas numa atmosfera de 5% de CO₂ humidificada. 48-60 h após a infecção, a sobreposição de agarose foi removida, as células foram tingidas com tinta violeta cristal e as placas visíveis foram contadas. A percentagem de formação de placas relativamente às placas de controlo infectadas (sem iota-carragenina) foi determinada para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 3, verificou-se que o iota-carragenina inibe, de uma forma dependente da dose, a formação de placas de vírus parainfluenza 3 em células Hep-2. Uma redução de 50% no número de placas (IC50) foi obtida a uma concentração de iota-carragenina de 10 µg/ml.

Exemplo 4: Efeito da pré-incubação com o iota-carragenina na formação de placas de vírus parainfluenza 3 em células HeLa.

As monocamadas confluentes de células HeLa foram incubadas três horas com o iota-carragenina a uma concentração de 13, 40, 133 e 400 µg/ml. O iota-carragenina contendo sobrenadante foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS e depois infectados com o vírus parainfluenza 3, tal como descrito no Exemplo 3, mas sem adição de iota-carragenina para a suspensão de vírus. A percentagem de formação de placa em relação ao controlo infectado (sem pré-tratamento de iota-carragenina) foi determinada para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na figura 4, verificou-se que o iota-carragenina inibe a formação de placas de vírus parainfluenza 3, a uma concentração de 400 e 133 µg/ml quando as células foram pré-incubadas durante três horas com o iota-carragenina, embora a iota-carragenina não estivesse presente no momento da infecção e durante todo o período de incubação subsequente a 37°C. Este resultado indica que o iota-carragenina quimicamente ou estruturalmente modifica os receptores da superfície da célula hospedeira, de tal forma que a ligação mediada pelo receptor do vírus parainfluenza 3 para a célula hospedeira é dificultada ou impedida, mesmo na ausência do agente de modificação de carragenina. Esta é também a prova de uma forte eficácia profilática do iota-carragenina.

Exemplo 5: Efeito do pré-tratamento de células eucarióticas de diferentes carrageninas na inibição da morte celular mediada por coronavírus.

As células CK subconfluentes foram infectadas na presença de iota-, kapa ou lambda-carragenina a uma concentração de 4, 40 e 400 µg/ml com coronavírus felino FIPV a uma moi (multiplicidade de infecção) de 0,1) (ver a fig. 5A). Em comparação, as células CK subconfluentes foram incubadas três horas com iota-, lambda ou kappa-carragenina a uma concentração de 4, 40 e 400 µg/ml. A carragenina contendo sobrenadante foi removida e as células foram lavadas três vezes com PBS e infectadas com coronavírus felino FIP (**moi** = 0,1), na ausência de polímero (ver Fig.5B). A percentagem de células viáveis em relação ao controlo não infectado foi determinada para cada carragenina e cada concentração.

Como mostrado na Figura 5A, todos os três tipos de carragenina inibem a morte celular mediada por o

coronavírus em células CK na concentração mais elevada de 400 µg/ml. Iota-carragenina ainda mostra uma inibição significativa a uma concentração de 4 µg/ml, enquanto kappa- e lambda-carragenina não são eficazes a esta concentração. Na Figura 5B, pode considerar-se que, em contraste com os vírus que entram na célula por meio de receptores de açúcar (ver exemplos anteriores), infecção por coronavírus não parece ser inibida devido a uma modificação química ou estrutural do receptor(s) específico(s) de coronavírus na superfície da célula hospedeira por carragenina, uma vez que não foi possível aumentar a protecção da célula hospedeira para além de um nível de inibição de 35%, mesmo na maior concentração de carragenina experimental de 400 µg/ml e a um período de pré-incubação de três horas. Nem o pré-tratamento das células hospedeiras com carragenina melhorou significativamente a protecção de células contra a infecção por coronavírus. Os resultados sugerem que, para se conseguir uma protecção significativa contra a infecção por coronavírus o agente activo anti-viral, isto é carragenina, tem de estar presente no momento da infecção, ou seja, quando uma interacção entre o vírus e a célula hospedeira está prestes a ocorrer.

Exemplo 6: Efeito do pré-tratamento de células eucarióticas por iota-carragenina na inibição da morte celular mediada por HRV8.

As células HeLa subconfluentes foram infectadas com o rinovírus humano tipo 8 (HRV8; $moi = 0,1$), na presença de iota-carragenina em concentrações de 4, 40 e 400 µg/ml (ver Fig.6A). Em comparação, as células HeLa subconfluentes foram incubadas durante três horas com o iota-carragenina a uma concentração de 4, 40 e 400 µg/ml antes da infecção. O

sobrenadante contendo iota-carragenina foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS e, em seguida, infectadas com HRV8 na ausência do polímero (ver Fig.6B). A percentagem de células viáveis em relação ao controlo não infectadas foi determinada para cada concentração de iota-carragenina.

Tal como mostrado na Figura 6A, iota-carragenina inibe a morte celular mediada por HRV8 em todas as concentrações. Na Figura 6B, pode considerar-se que, em contraste com os vírus que entram na célula por meio de receptores de açúcar, a morte celular mediada por HRV8, não foi inibida em mais de 5%, mesmo a 400 µg/ml e em que as células foram pré-incubadas durante três horas com iota-carragenina. Este resultado é consistente com resultados anteriores (dados não mostrados), sugerindo que, para HRV8 a pré-incubação das células alvo com carragenina não protege significativamente as células alvo a partir de infecção se carragenina está ausente no momento da infecção. Este resultado indica que o receptor para HRV8, o receptor de LDL, não está modificado ou mascarado pelo tratamento com o iota-carragenina.

Exemplo 7: Iota-carragenina é removida quantitativamente a partir de células HeLa por lavagem das células com PBS.

As células HeLa foram incubadas com iota-carragenina marcada com FITC a uma concentração de 400, 133, 4 e 0,4 µg/ml, durante 10 minutos, em seguida, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS. A quantidade de resíduo com carragenina marcada com FITC foi determinada com um leitor de detecção fluorescente (BMG-Omega) após a remoção do sobrenadante contendo iota-carragenina marcada com FITC com e depois de cada etapa de

lavagem. As unidades de luz fluorescente que foram convertidos em valores de concentração de carragenina $\mu\text{g/ml}$, utilizando uma curva padrão.

Como mostrado na Figura 7 com iota-carragenina marcada com FITC foi removida quantitativamente ($> 95\%$) a partir de células HeLa por lavagem as células pelo menos três vezes com PBS. Este resultado comprova que carragenina não liga covalentemente à superfície das células. O resultado foi confirmado por uma segunda série experimental, em que o período de incubação foi prolongado a partir de 10 minutos até 3 horas, utilizando o mesmo método de detecção. Os resultados obtidos, portanto, suportam as conclusões aqui tiradas e os exemplos dizem respeito a carragenina que induz uma modificação dos receptores de açúcar na superfície das células alvo envolvidas na ligação dos viriões, cuja modificação ainda está presente após a remoção do polímero da superfície da célula alvo.

Exemplo 8: Efeito do pré-tratamento de células eucarióticas por iota-carragenina na inibição da morte celular mediada por VSR.

As células Vero subconfluentes foram infectadas, na presença de iota-carragenina em concentrações de 0,4, 4 e 40 $\mu\text{g/ml}$ com o VSR ($\text{moi} = 0,1$). Em comparação, as células Vero subconfluentes foram incubadas durante três horas com iota-carragenina a uma concentração de 0,4, 4 e 40 $\mu\text{g/ml}$. O iota-carragenina contendo sobrenadante foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS e infectados com o VSR ($\text{moi} = 0,1$), na ausência de carragenina. A percentagem de células viáveis em relação ao controle não infectadas foi determinada para cada concentração de carragenina.

Tal como mostrado na Figura 8, iota-carragenina inibe a morte celular mediada por VSR em todas as concentrações, mesmo se o polímero estiver ausente no momento da infecção e durante. Sabe-se que o VSR atribui às células por meio de sulfato de heparina, uma molécula de açúcar que está presente na superfície de células epiteliais. Os resultados indicam que este receptor é modificado por iota-carragenina e o acessório de VSR para a superfície celular e a replicação viral subsequente é assim bloqueada.

Exemplo 9: Efeito do tratamento de células eucarióticas com iota-carragenina em diferentes pontos de tempo após a infecção por VSR na inibição da morte celular mediada por células HNep

As células HNep subconfluentes foram infectadas com o VSR ($\text{moi}=0,1$). Iota-carragenina foi adicionada a uma concentração final de 40 $\mu\text{g/ml}$ em pontos de tempo diferentes após a infecção, como indicado na Fig. 9 (0, 8, 24, 32, 48, 56 e 72 h após a infecção) e a percentagem de viabilidade de células HNep em relação ao controlo não infectado foi determinado para cada ponto de tempo.

Tal como mostrado na Figura 9, iota-carragenina significativamente inibe a morte celular mediada por VSR a uma concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, mesmo quando o polímero foi acrescentado apenas 24 horas após a infecção. Este resultado demonstra que a iota-carragenina não só pode ser usada profilacticamente, mas também podem exercer uma eficácia anti-viral no decurso de um tratamento terapêutico, quando aplicado na fase inicial da infecção viral.

Exemplo 10: Efeito de um tratamento profilático com iota-carragenina na inibição da morte celular mediada por VSR em células HNep

As células HNep subconfluentes foram infectadas, na presença de iota-carragenina a uma concentração de 400, 133, 44, 15, 5, 2 e 1 µg/ml com o VSR (moi = 0,1). A percentagem de células HNep viáveis relativamente a um controlo não infectado foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 10, iota-carragenina inibe significativamente a morte celular mediada por VSR, mesmo a uma concentração tão baixa quanto 1 µg/ml quando o polímero estava presente durante a infecção. Este resultado demonstra que a iota-carragenina pode ser utilizada eficazmente para as estratégias de intervenção profilática.

Exemplo 11: Efeito do tratamento de células eucarióticas de diferentes carrageninas na inibição da morte celular mediada por VSR em células HEp-2.

As células HEp-2 em placas de 6 alvéolos foram infectadas na presença de iota-, kappa ou lambda-carragenina a uma concentração de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µg/ml, com vírus VSR A2 (moi = 0,001). A percentagem de células viáveis em relação ao controlo não infectadas foi determinado para cada carragenina e cada concentração.

Tal como mostrado na Figura 11, todos os três tipos de carragenina inibem a morte celular mediada por VSR em células HEp-2 com o iota-carragenina mostrando o efeito mais forte.

Exemplo 12: Comparação do efeito do tratamento de células eucarióticas por iota-carragenina e fucoidano na inibição da morte celular mediada por VSR.

As células HNep subconfluentes foram infectadas, na presença de iota-carragenina e fucoidano a uma concentração de 400, 133, 44, 15, 4, 1,3 e 0,4 com o VSR (moi = 0,1). A percentagem de células viáveis HNep relativamente a um controlo não infectado foi determinado para cada um iota-carragenina e cada concentração de fucoidano.

Como mostrado na Figura 1 2, o fucoidano inibe significativamente a morte celular mediada por VSR em células HNep a uma concentração de 0,4 µg/ml quando o polímero está presente durante a infecção. Fucoidan é, portanto, um candidato interessante para o desenvolvimento de produtos para a profilaxia e tratamento de infecções por VSR.

Exemplo 13: Efeito do tratamento de células eucarióticas com diferentes carrageninas e fucoidano na inibição de vírus parainfluenza 3 de morte celular mediada.

As células HNep subconfluentes foram infectadas, na presença de qualquer um iota-, kappa, lambda-carragenina ou fucoidano a uma concentração de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 e 0,4 µg/ml com o vírus parainfluenza tipo 3. A percentagem de viabilidade (daí não infectado) células HNep relativas ao controlo não infectado foi determinaoa para cada polímero e cada concentração de polímero.

Como mostrado na Figura 13, todos os três tipos de carragenina inibem a morte celular mediada pelo vírus parainfluenza 3 em células HNep com iota-carragenina

mostrando o efeito mais forte. O fucoïdano inibe também morte celular mediada pelo vírus parainfluenza 3 por células em células HNep numa proporção comparável ao efeito inibidor de kappa-e lambda-carragenina.

Exemplo 14: Efeito do tratamento de células com diferentes eikaryotic carrageninas e fucoïdan sobre a inibição do vírus da gripe H3N2 a morte celular mediada.

Células HNep subconfluentes foram infectadas, na presença de iota-, kappa, lambda-carragenina e fucoïdano a uma concentração de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 e 0,4 µg/ml com o vírus da gripe H3N2. A percentagem de células viáveis HNep em relação ao controlo não infectadas foi determinada para cada polímero e cada concentração de polímero.

Como mostrado na Figura 14, todos os três tipos de carragenina inibem a morte celular mediada pelo vírus influenza H3N2 em células HNep. Além disso, verificou-se que o fucoïdano inibe a morte celular mediada pelo vírus da gripe H3N2 em HNep numa extensão comparável à do iota-carragenina.

Exemplo 15: Efeito de diferentes carreganinas e fucoïdano sobre a formação de placas do vírus da gripe aviária H5N1 em células MDCK.

As suspensões de vírus contendo 60-80 ufp de vírus da gripe das aves H5N1 foram misturados com uma solução de reserva de polímero ou de iota-, kappa, lambda-carragenina ou fucoïdano para concentrações de polímero final de 400 ou 44,4 µg/ml. As monocamadas confluentes de a linhagem celular de rim canino MDCK em placas de seis alvéolos foram infectadas com suspensões de vírus durante 60 minutos a

34°C. Os inóculos de infecção foram removidos e as células foram lavadas com PBS e sobrecamada de agarose contendo 0,6% de agarose foi adicionado. As placas foram incubadas a 36° C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ no ar. 48-60 h após a infecção a sobrecamada de agarose foi removida, as células foram tingidas com tinta violeta de cristal e as placas visíveis foram contadas. A percentagem de formação de placas relativamente ao controlo infectado (sem polímero de tratamento) foi determinada para cada polímero e cada concentração de polímero.

Como mostrado na Figura 15, verificou-se que a formação de placa do vírus da gripe das aves H5N1 não foi influenciada por iota- e lambda carragenina e fucoidano. No entanto, a kappa-carragenina inibe, de uma forma dependente da dose, a formação de placas do vírus da gripe das aves H5N1 em células MDCK. Uma vez que o vírus da gripe aviária, de preferência liga-se a resíduos de ácido siálico alfa 2-3 ligação com os resultados indicam que o kappa-carragenina pode preferencialmente modificar tais resíduos de ácido siálico com ligação 2-3.

Exemplo 16: Efeito do tratamento de células eucarióticas profiláticas com iota-carragenina na inibição de morte celular mediada por adenovírus do tipo B (AD50).

As células HNep subconfluentes foram infectadas, na presença de iota-carragenina a uma concentração de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 e 0,4 µg/ml com AD50. A percentagem de células HNep viáveis em relação ao controlo não infectado foi determinada para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 16, iota-carragenina inibe significativamente a morte celular mediada por AD50 mesmo a uma concentração tão baixa quanto 4 µg/ml quando o polímero está presente no momento da infecção e durante. Este resultado é uma indicação de que o iota-carragenina pode ser utilizada para estratégias de intervenção profilática eficazes contra o adenovírus do subtipo B (p.ex. Ad50). No entanto, quando outros adenovirus de subtipos A, C e D foram testados num conjunto experimental como descrito anteriormente nenhum efeito significativo do iota-carragenina foi detectado (dados não mostrados).

Exemplo 17: Comparação do efeito do tratamento de células eucarióticas profiláticas com iota-carragenina na inibição da morte celular mediada por AD50.

As células HNep subconfluentes foram infectadas, na presença de iota-carragenina a uma concentração de 400, 40 e 4 µg/ml com Ad50. Em comparação, as células HNep subconfluentes foram incubadas durante três horas com o iota-carragenina a uma concentração de 400, 40 e 4 µg/ml antes da infecção. O sobrenadante contendo iota-carragenina foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS e infectadas com AD50 na ausência de carragenina. A percentagem de células viáveis HNep em relação ao controle não infectadas foi determinada para cada concentração de iota-carragenina.

Tal como mostrado na Figura 17, iota-carragenina inibe significativamente a morte celular mediada por AD50 a uma concentração de 400 e 40 µg/ml, na presença e na ausência de iota-carragenina no momento da infecção e durante o período de infecção observada. Estes dados indicam que a iota-carragenina modifica o receptor da superfície da

célula para o adenovírus do subtipo B, que é conhecido por ser um receptor de açúcar, ao passo que os adenovírus de outros subtipos provavelmente entram na célula através de diferentes receptores.

24-05-2013

REIVINDICAÇÕES

1. Iota-carragenina numa quantidade antiviral eficaz para uso como um ingrediente activo anti-viral numa composição farmacêutica ou medicamento para o tratamento profilático ou terapêutico de um sintoma, e condição ou doença causada por ou associada a uma infecção por um vírus respiratório seleccionado de entre o grupo consistindo em paramyxovirus, vírus influenza A humano, e adenovírus do subtipo B.
2. Iota-carragenina para utilização como reivindicado na reivindicação 1, em que o referido paramixovírus é seleccionado a partir do grupo constituído por vírus parainfluenza humano (HPV) do tipo 1, HPV do tipo 2, o HPV do tipo 3, e HPV do tipo 4 VSR.
3. Iota-carragenina para utilização como reivindicado na reivindicação 1 ou 2, em que a referida condição patológica ou doença é seleccionada do grupo que consiste em bronquite aguda, bronquite crónica, rinite, sinusite, laringite, bronquiolite aguda, faringite, amigdalite, laringite, traqueíte, asma e pneumonias, e em que o referido sintoma é seleccionado do grupo consistindo em febre, dor, tonturas, tremores, transpiração, e desidratação.
4. Iota-carragenina para utilização como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a composição farmacêutica anti-viral ou medicamento é adaptado para uso tópico da pele ou mucosa e é preferencialmente preparada como uma loção, creme, pomada, gel, pó, incluindo um pó para inalação, spray, espuma, gotas de líquidos ou uma solução de gargarejo.

5. Iota-carragenina para utilização como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a composição farmacêutica anti-viral ou medicamento é adaptado para administração oral, e é preferencialmente preparada como uma solução líquida, ou como uma preparação semi-sólida ou sólida, tal como uma seco pó, comprimidos, cápsulas ou drageias.

6. Iota-carragenina para utilização como reivindicado na reivindicação 4 ou 5, em que a composição é um líquido e ou um semi-sólido e compreende, como uma preparação pronta a usar de iota-carragenina numa quantidade de entre 0,01% e 10%, de preferência entre 0,01% e 5%, mais preferencialmente entre 0,1% e 2%, em peso, em relação ao volume total da preparação.

7. Iota-carragenina para utilização como reivindicado na reivindicação 5, em que a composição é sólida e compreende, como uma uso preparação pronta a usar de iota-carragenina numa quantidade de entre 0,01% e 10%, de preferência entre 0,01% e 5%, mais preferencialmente entre 0,1% e 2% em peso.

8. Iota-carragenina para utilização como reivindicado na reivindicação 1, em que a composição compreende ainda de kappa-carragenina, em que a composição compreende 50% ou mais, de preferência 70% ou mais, e especialmente 95% ou mais por peso seco de iota-carragenina, relativa ao peso seco total de carrageninas presentes na composição.

9. Iota-carragenina para utilização como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a referida composição compreende pelo menos um veículo farmaceuticamente aceitável e/ou aditivo, o referido aditivo farmaceuticamente aceitável, de preferência seleccionado de sódio e cloreto de

potássio e estar presente na composição em numa quantidade de 1% ou menos, de preferência de 0,6% ou menos.

10. Iota-carragenina para utilização como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a composição compreende uma parte ou a totalidade de iota-carragenina por via do seu sal, de preferência por meio de um sal de sódio.

11. Iota-carragenina para utilização como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a composição está ligada por qualquer revestimento ou de impregnação de uma superfície sólida de um produto sanitário ou de higiene, em especial luvas ou papel de higiene sanitária, tecido ou papel, especialmente um tecido nasal ou de papel, um cotonete de algodão, máscara de poeira ou máscara facial sanitária ou médica.

12. Iota-carragenina para utilização como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a composição está integrada num batom.

13. Iota-carragenina para utilização como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que a composição compreende ainda um composto fisiologicamente activo não carragenina, o referido composto, opcionalmente, como o principal ingrediente activo.

14. Iota-carragenina para utilização como reivindicado na reivindicação 13, em que a iota-carragenina está presente como eficaz adjuvante anti-paramyxoviral ou anti-vírus influenza A humano em conjunto com um ou mais substâncias fisiologicamente activas não-carragenina que são tipicamente aplicadas na profilaxia ou terapia de doenças infecciosas

e/ou inflamatórias, alergias e/ou condições de um sistema imunológico prejudicado ou debilitado.

15. Iota-carragenina para utilização como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, em que o sintoma patológico ou a doença presente num indivíduo que é um paciente de alto risco seleccionado de entre o grupo consistindo num paciente de doença pulmonar obstrutiva crónica COPD, paciente com asma, um pessoas com alergias, uma pessoa com o sistema imunológico, cardíaco ou pulmonar debilitado, e um paciente de transplante.

24-05-2013

[

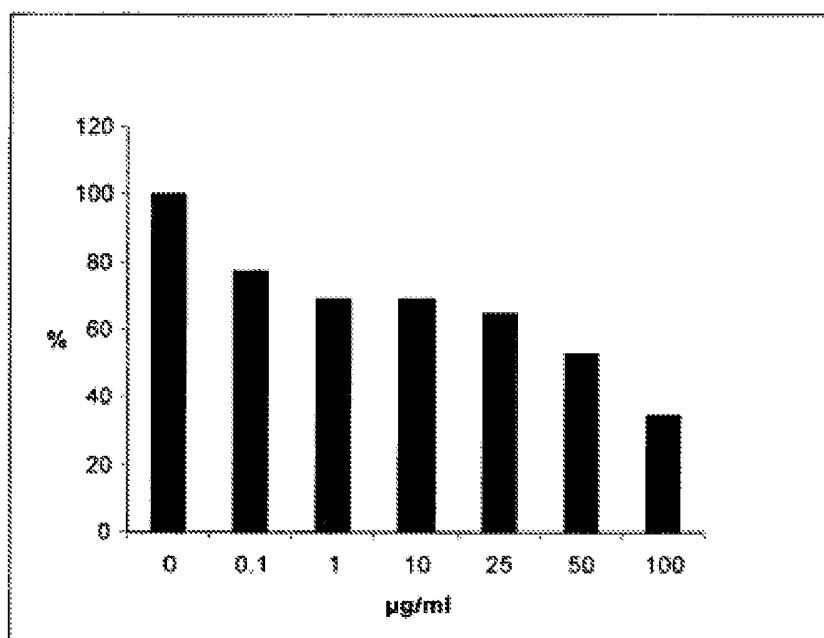


Fig. 1

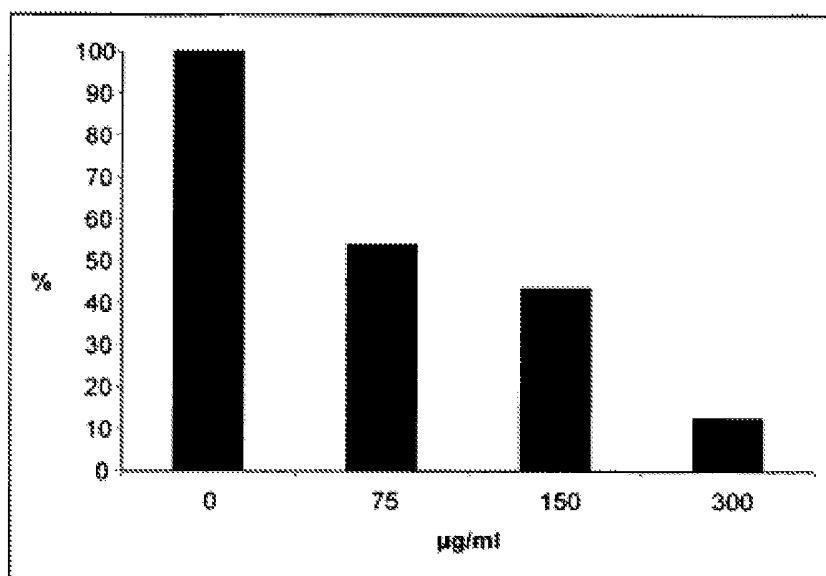


Fig. 2

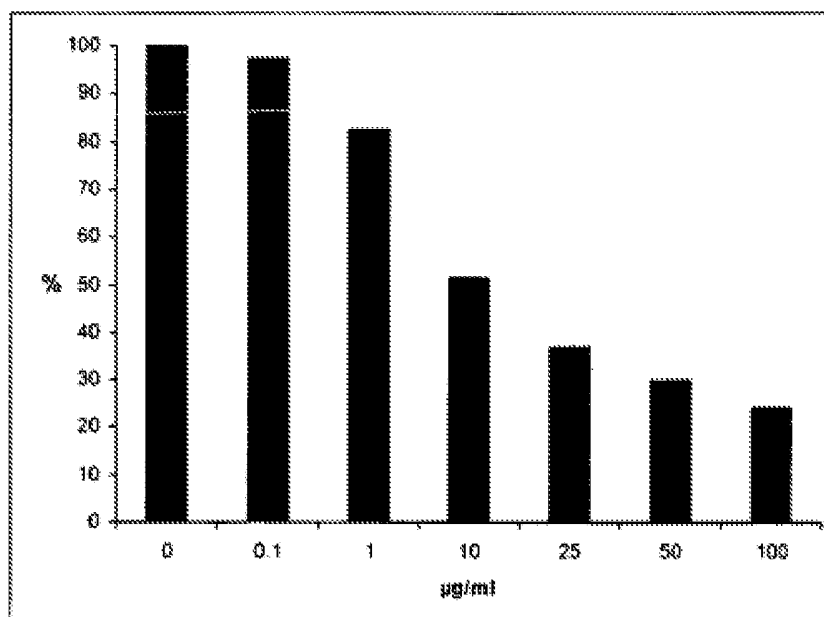


Fig.3

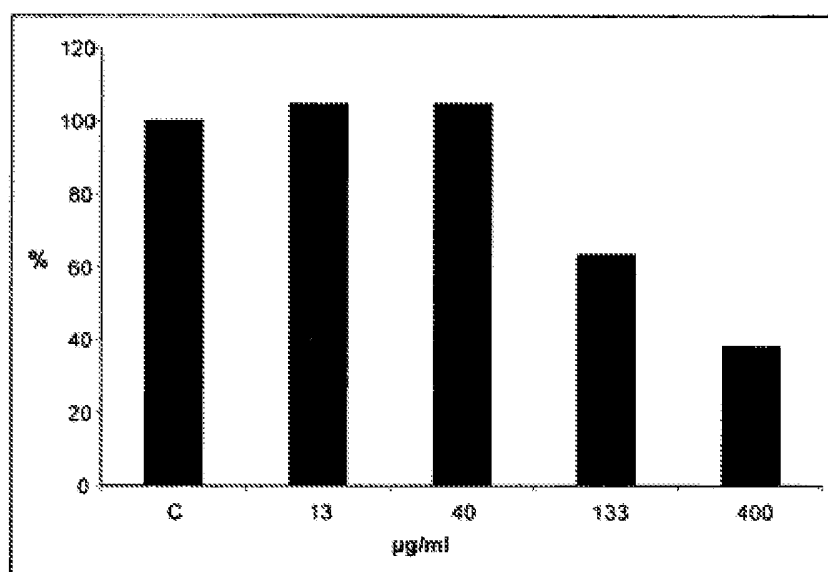


Fig.4

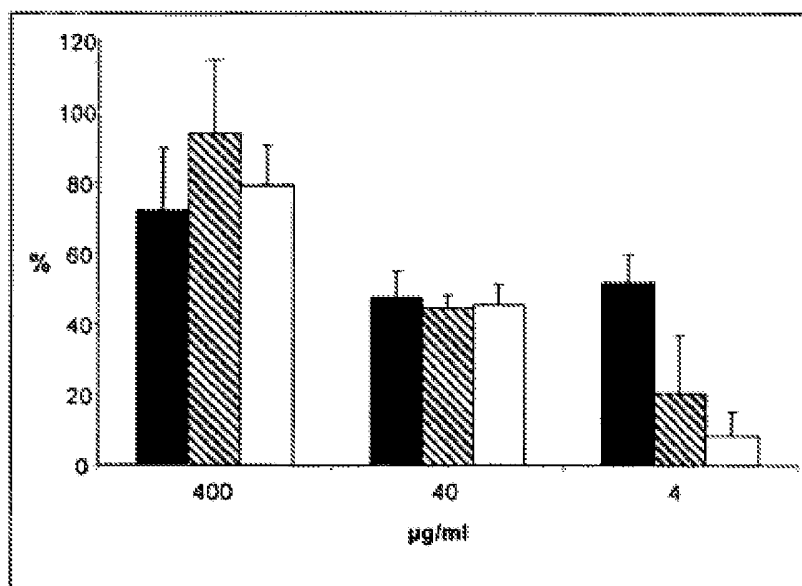


Fig.5A

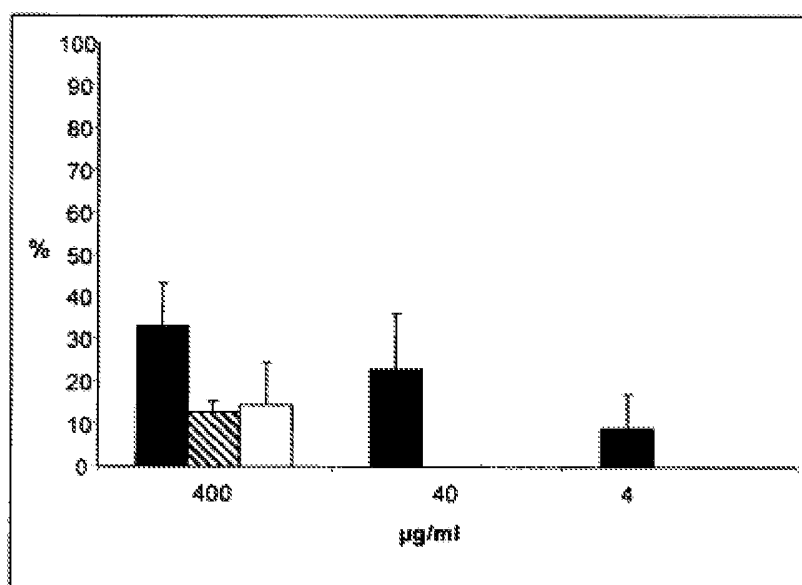


Fig.5B

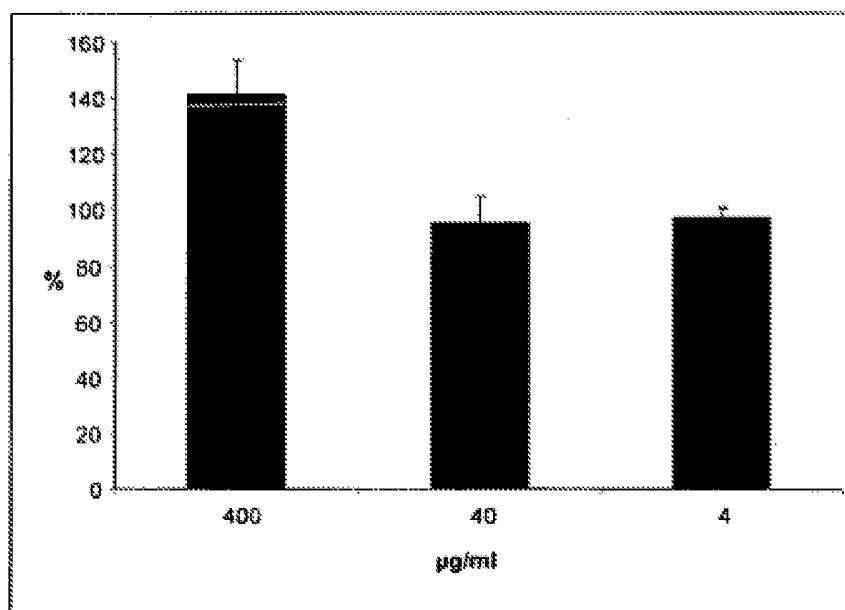


Fig.6A

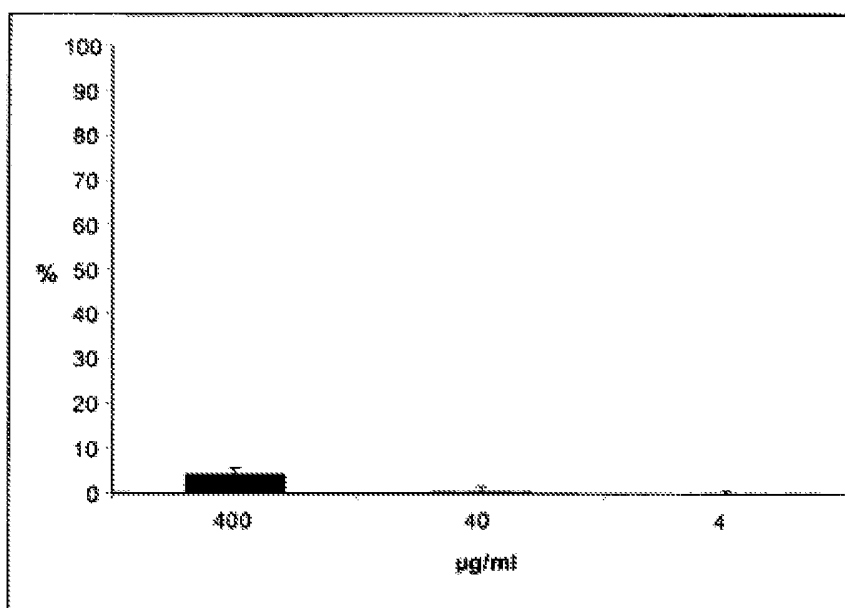


Fig.6B

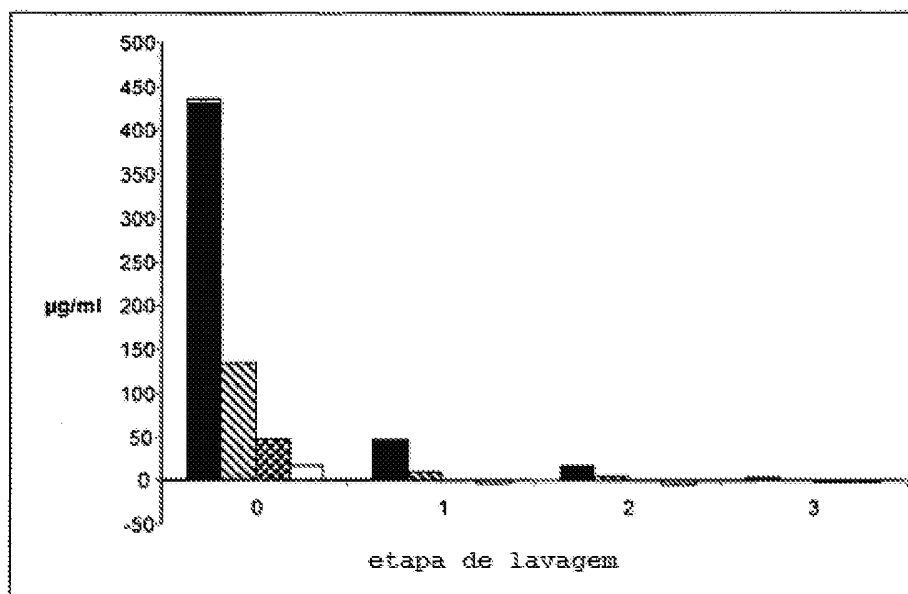


Fig.7

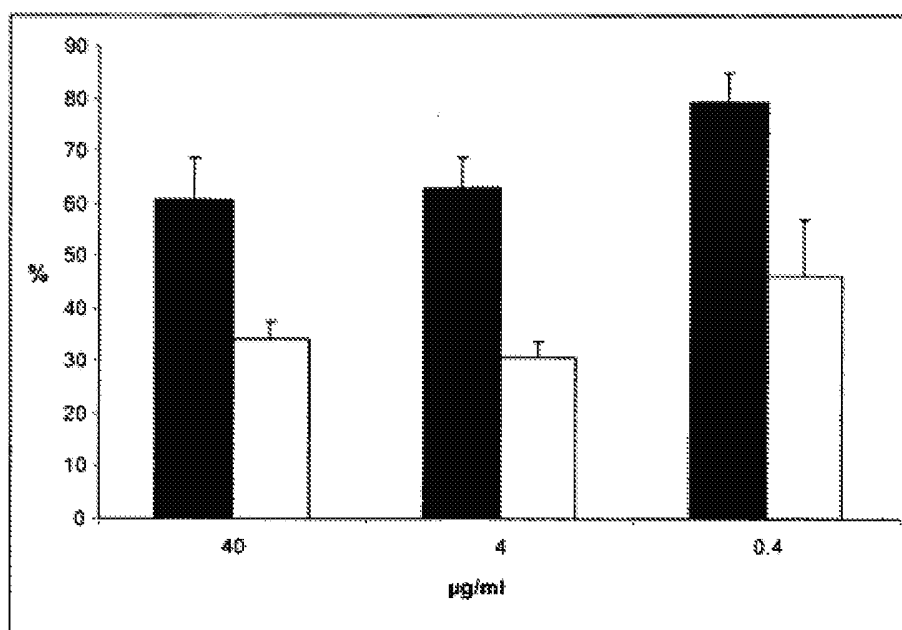


Fig.8

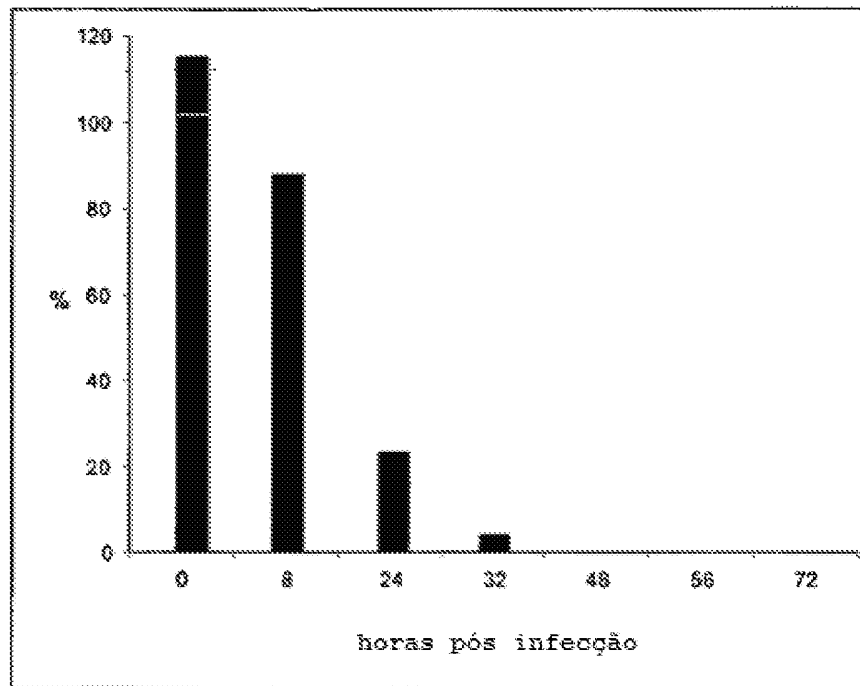


Fig.9

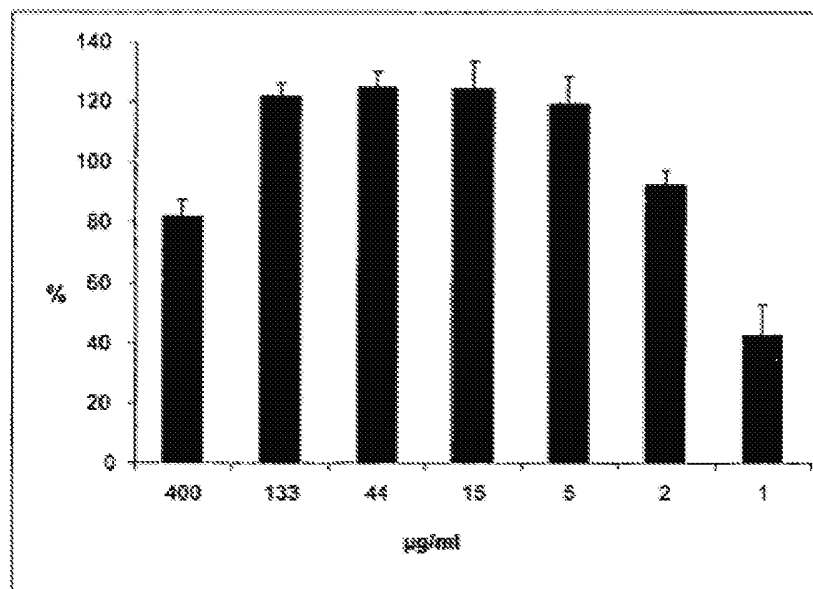


Fig.10

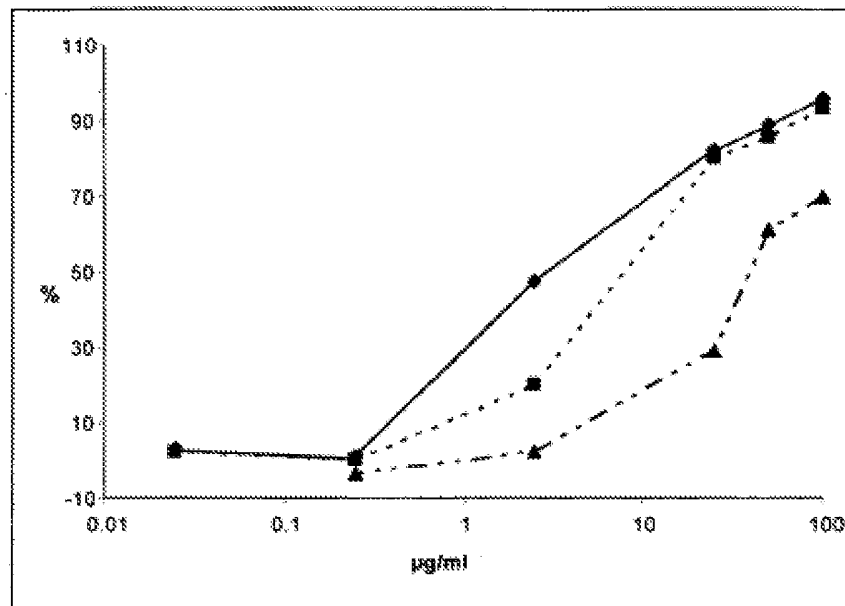


Fig.11

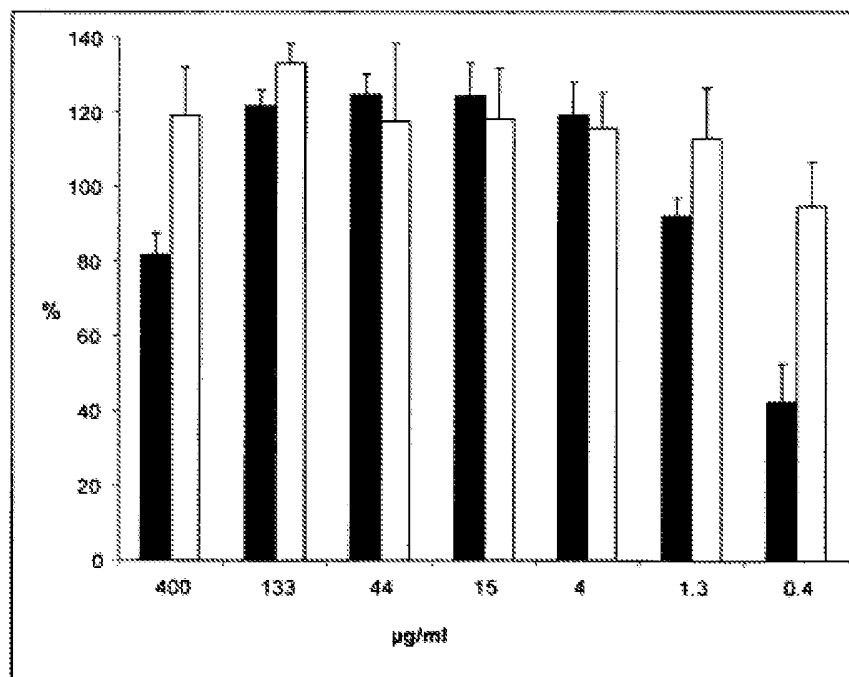


Fig.12

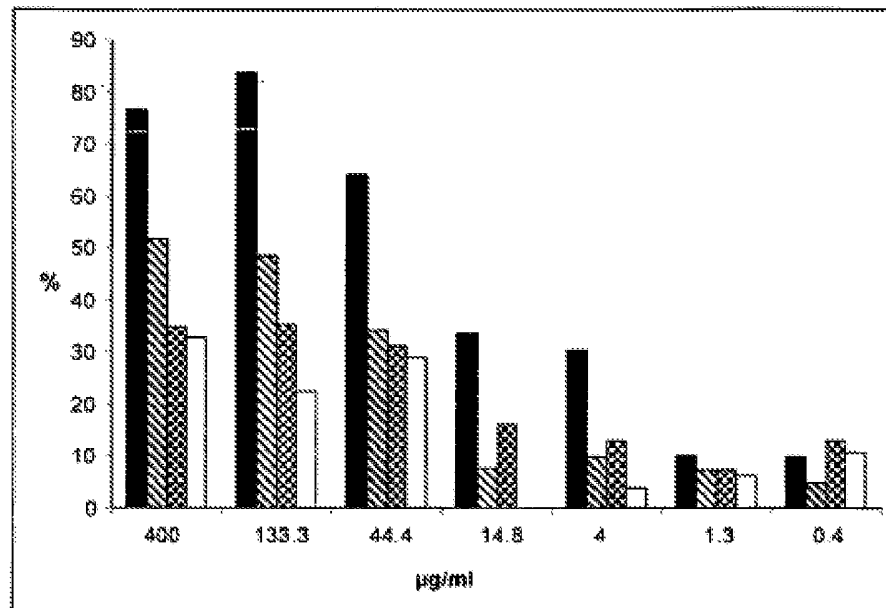


Fig.13

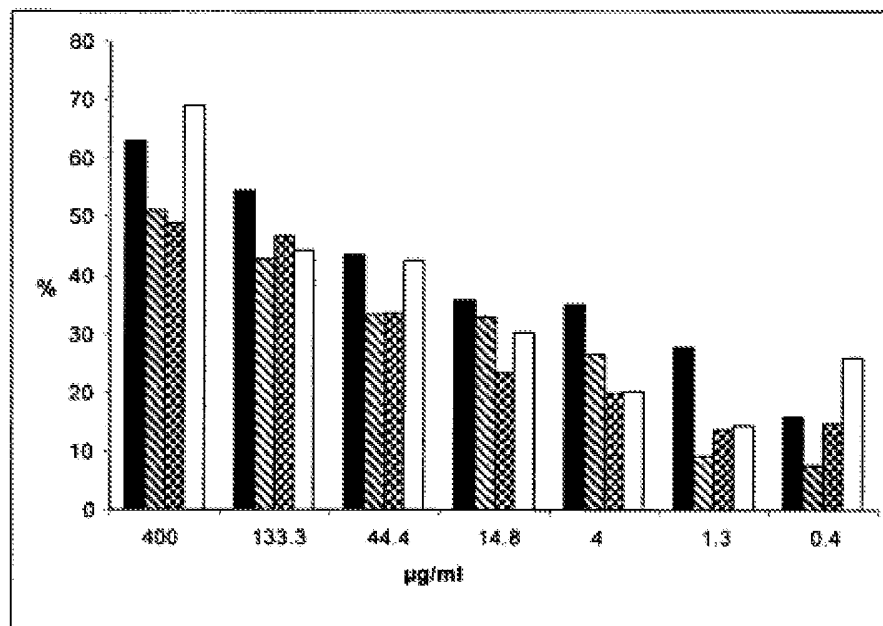


Fig.14

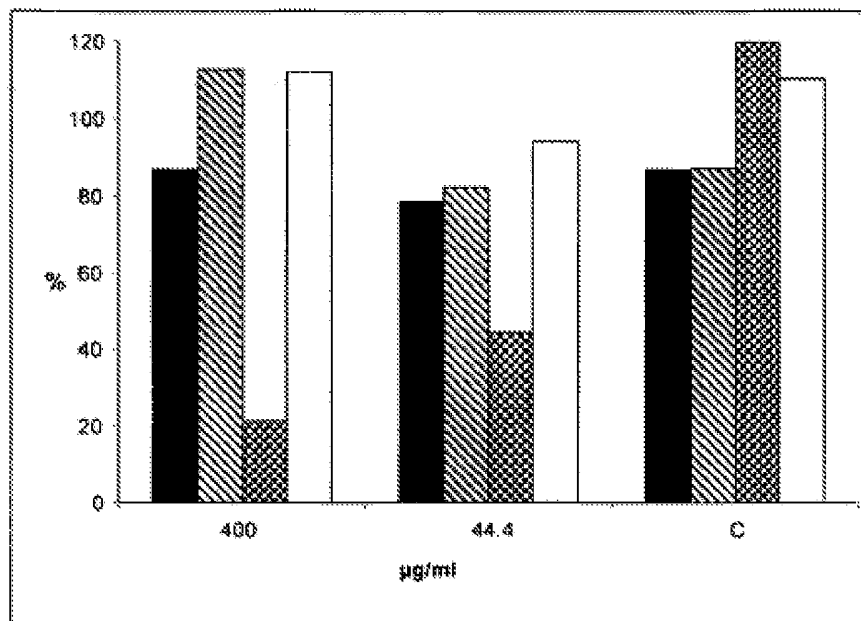


Fig.15

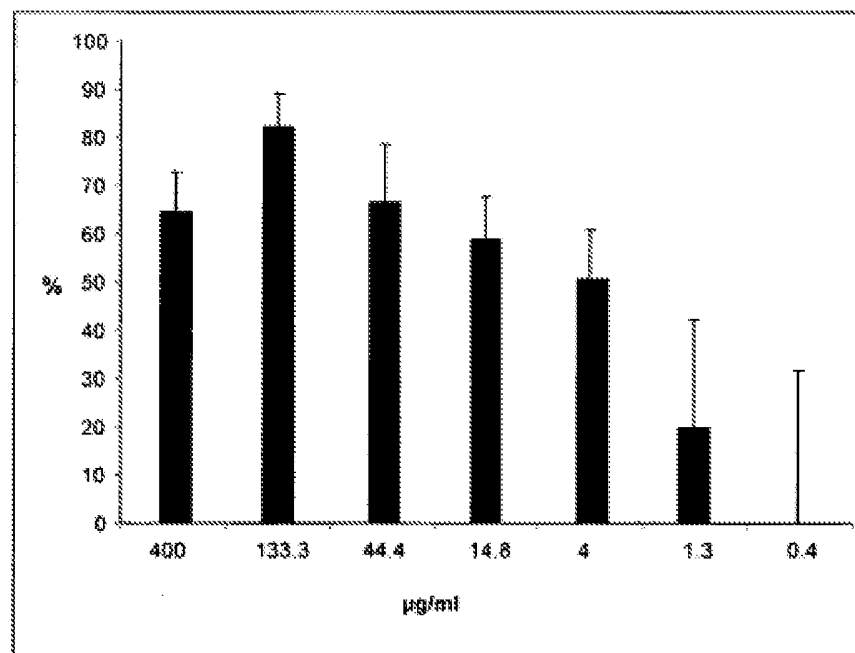


Fig.16

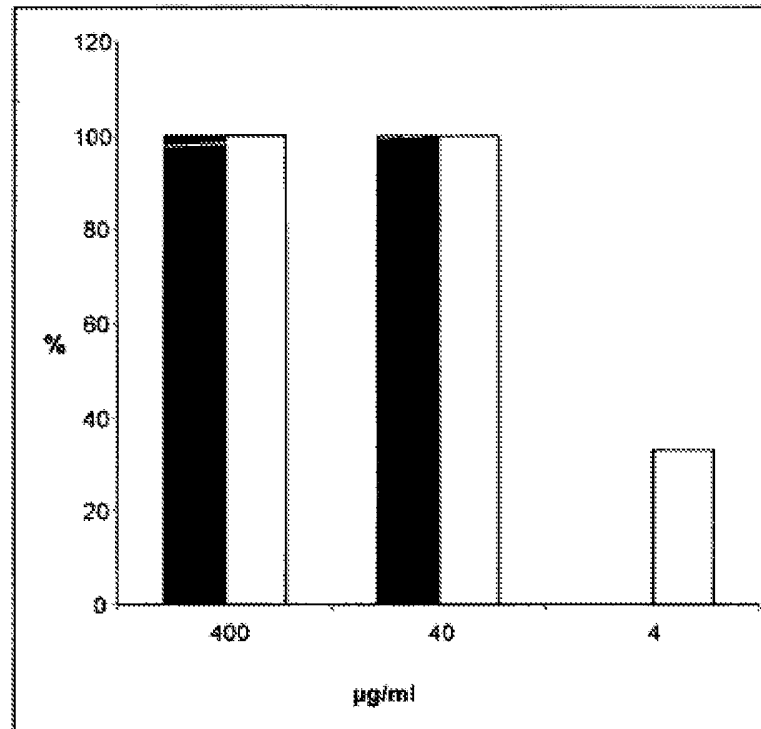


Fig.17