

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 532**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2009.01)
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2020** **E 20173355 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2024** **EP 3906934**

54 Título: **Aplicación de dalargina para uso en la prevención de infecciones respiratorias víricas y prevención del desarrollo de complicaciones durante las infecciones respiratorias víricas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2025

73 Titular/es:

PVP LABS PTE. LTD. (100.00%)
1 Coleman Street 10-06
The Adelphi, Singapore 179803, SG

72 Inventor/es:

CHERTORIZHISKY, EVGENY ALEXANDROVICH;
KOSORUKOV, VYACHESLAV STANISLAVOVICH;
KLEIMENOV, ALEKSEY VIKTOROVICH y
MELNIKOV, GENNADY DMITRIEVICH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 3 002 532 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

Aplicación de dalargina para uso en la prevención de infecciones respiratorias víricas y prevención del desarrollo de complicaciones durante las infecciones respiratorias víricas

Técnica pertinente

- 5 La invención se refiere a farmacia y medicina y se refiere a la aplicación de una solución de Dalargina en forma de pulverización para la irrigación de la cavidad oral y/o la nasofaringe en forma de inhalaciones utilizando un nebulizador para la prevención de infecciones respiratorias víricas (IRV) y/o para la prevención de sus complicaciones, especialmente en las etapas tempranas de la enfermedad.

Estado de la técnica

- 10 Las IRV son actualmente el tipo más común de infecciones, representando más del 90% de todas las enfermedades infecciosas [1, 2]. Las epidemias de gripe, durante las cuales aproximadamente del 5 al 15% de la población se infecta, se producen casi anualmente. Según la OMS, aproximadamente 1000 millones de personas contraen la gripe cada año, con 3-5 millones de casos graves y 290000 a 650000 muertes en todo el mundo por problemas respiratorios relacionados con la gripe. La carga social de las IRV se caracteriza principalmente por altos costes indirectos, tales como costes durante el período de ausencia del lugar de trabajo, pérdidas económicas debidas a una menor productividad laboral reducida y costes de ausencia del lugar de trabajo de miembros de la familia que se ocupan del paciente (solo las pérdidas económicas en los Estados Unidos debidas a una discapacidad temporal se evalúan a 232 millones de dólares) [3, 2]. Globalmente, se gasta un promedio de aproximadamente 14.600 millones de dólares estadounidenses en el tratamiento de pacientes con IRV y gripe.
- 15 Para Rusia este problema es extremadamente importante debido a sus características geográficas y climáticas. En Rusia se registran anualmente de 27,3 a 41,2 millones de casos de infecciones respiratorias. Las IRV tienen una alta proporción en la estructura de morbilidad global: representan casi el 40% de los días de discapacidad [2, 4]. En particular, la gripe se caracteriza por un desarrollo comparativamente frecuente de complicaciones graves, implicación frecuente del tracto respiratorio inferior con neumonía progresiva y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) en niños, así como en pacientes jóvenes, de mediana edad y ancianos. Por ejemplo, el principal problema entre pacientes hospitalizados con gripe A/H1N1/09 en casi todos los países fue insuficiencia respiratoria aguda progresiva: se diagnosticó neumonía en el 40-100% de los pacientes y SDRA en el 10-56% de los pacientes [5]. La tasa de letalidad para diversos tipos de IRV puede estar entre 0,05% y 5%, o incluso más para patógenos individuales.
- 20 Estas cifras indican la alta carga de los diversos tipos de IRV, así como sus graves consecuencias sociales y económicas a escala global. Muestran convincentemente que es importante proteger la población durante epidemias estacionales de IRV y necesario tener tratamientos antivíricos adecuados para la gama más amplia posible de patógenos víricos. Por lo tanto, la prevención de la propagación de este grupo de enfermedades es un objetivo importante para cualquier país.
- 25 Las IRV son notables debido a una amplia gama de virus que causan enfermedades similares a la gripe, que incluyen más de 200 especies diagnosticables. Los patógenos más comunes incluyen rinovirus, virus de la gripe, virus de la parainfluenza, virus respiratorio sincitial (RSV), coronavirus, metapneumovirus, bocavirus y adenovirus [2, 6].
- 30 Las IRV pueden ser frecuentemente graves, especialmente en pacientes con un sistema inmunitario o comorbilidades comprometidos. Las manifestaciones de las IRV graves incluyen neumonía, particularmente en forma de síndrome de dificultad respiratoria aguda [7].
- 35 Las IRV de diferentes tipos están asociadas con exacerbaciones de enfermedades crónicas; adicionalmente, las IRV pueden implicar una amplia gama de secuelas, tales como:
- Complicaciones pulmonares (neumonía, bronquitis, SDRA);
 - Complicaciones del tracto respiratorio superior y de ENT (otitis, sinusitis, rinitis y traqueitis) ;
 - Complicaciones cardiovasculares (miocarditis, pericarditis);
 - 45 Complicaciones del sistema nervioso (meningitis, meningoencefalitis encefalitis, neuralgias y polirradiculoneuritis);
 - Infecciones secundarias;
 - Insuficiencia renal aguda, de 14% a 53%;
 - Choque séptico, 4% a 8%;
 - 50 Cardiomiopatía, incluyendo cardiomiopatía crítica en el 33% de casos;

Afectación del tracto gastrointestinal.

El desarrollo de complicaciones usualmente cambia profundamente y complica enormemente la terapia de la enfermedad. Por ejemplo, la mortalidad entre pacientes con enfermedad grave por coronavirus 2019 (COVID-19) que requieren ventilación mecánica es tan alta como 70-80%, aunque en la admisión la enfermedad puede ser leve o moderada, sin afectación pulmonar grave. La eficacia del tratamiento de neumonía usando los métodos y protocolos existentes es limitada. Por esta razón, la forma más apropiada de luchar contra esta enfermedad implicaría prevenir complicaciones en las primeras etapas de la enfermedad o prevenir la infección como tal.

Para prevenir complicaciones y fatalidades, es extremadamente importante llevar a cabo terapia antivírica para eliminar la posibilidad de infección y el desarrollo de la enfermedad, así como tomar medidas profilácticas para prevenir la progresión de la enfermedad hacia el desarrollo de todos los tipos de complicaciones.

En la prevención de enfermedades víricas actualmente se usan los siguientes enfoques.

a) Vacunas. En la práctica estándar de la prevención de IRV, este enfoque se emplea casi exclusivamente contra la gripe. Para la mayoría de los otros tipos de virus que causan IRV, la vacunación tiene poco sentido, ya que existe un cierto nivel de inmunidad desde la infancia, la enfermedad es leve, o las vacunas protectoras inmunógenas como tales son inexistentes. Las vacunas de la gripe polivalentes que se usan para la vacunación profiláctica se basan en recomendaciones de la OMS referentes a serotipos de gripe que se anticipa que son activos en la próxima estación. La eficacia de las vacunas contra la gripe es del 75-90%.

La vacunación es especialmente importante para personas en riesgo de complicaciones y para aquellas que comparten espacio vital con o que se ocupan de individuos en riesgo.

Por otro lado, la vacunación como un método para prevenir la morbilidad y, en particular, la gripe, tiene una serie de inconvenientes:

- La vacunación no proporciona una garantía absoluta de que se prevenga la enfermedad, de que el tipo de gripe en el año en curso coincida con el tipo predicho; mientras tanto, las vacunas contra la gripe son solo eficaces durante 1 año.
- La vacunación contra la gripe no es para todos. Está contraindicado para aquellos con alergias a proteínas de pollo o antecedentes de reacciones alérgicas a vacunas de la gripe.
- En caso de una epidemia o pandemia de gripe en curso, a menudo no hay tiempo suficiente para desarrollar una fuerte inmunidad en respuesta a la vacunación, lo que reduce sustancialmente el efecto de la vacunación en la población.
- La vacunación como un método para prevenir las IRV causadas por la gama más amplia de patógenos es menos efectiva, ya que no hay disponible ninguna vacuna contra la mayoría de los patógenos, o rápidamente se vuelve irrelevante debido a la alta variabilidad de las proteínas del núcleo viral.

b) Inmunomoduladores. Otro enfoque para la profilaxis de las IRV se basa en la administración de diversos inmunomoduladores. Incluyen productos del timo, interleucinas, interferones, péptidos biológicamente activos, polisacáridos de ciertos hongos y vacunas terapéuticas. Su actividad se basa en la capacidad de alterar el metabolismo celular y tisular y activar las células inmunocompetentes. Este grupo farmacológico es extremadamente diverso e incluye varios subgrupos: interleucinas, interferones, inductores de interferón y otros inmunomoduladores.

Las interleucinas y los interferones son productos fabricados biotecnológicamente basados en proteínas endógenas: Interferón leucocitario de ser humano, Egiferon, productos del grupo de los interferones alfa (Reaferon, Roferon, Intron A, Inrec, Viferon, Realdiron, Berofor, Egiferon, Velferon), interferones beta (Betaseron, Fron, Betaferon, Rebif, Bioferon, Avonex) e interferones gamma. La gama de aplicaciones de estos productos es bastante amplia: Son eficaces contra los virus de la gripe y los virus que causan otras enfermedades respiratorias, los virus de la hepatitis B y C, CMV, el virus del sarampión y el virus del SIDA. En algunos casos, este grupo de productos es bastante eficaz. Sin embargo, las desventajas incluyen a menudo una respuesta altamente variable y un gran número de efectos secundarios, que pueden incluir fiebre, dolor de cabeza, mialgia, artralgia, anafilaxia, presión sanguínea baja, taquicardia, etc.

Las interleucinas e interferones tienen que administrarse bajo supervisión médica y no pueden usarse como una intervención profiláctica.

Los fármacos usados en la profilaxis de las IRV incluyen productos inmunotrópicos de grupos tales como "inductores de interferón" y "otros inmunomoduladores", que normalmente presentan efectos inmunoestimulantes e inmunomoduladores. Los medicamentos orales incluyen Kagocel, Arbidol, Ingavirina, Amixina y Groprinosin. Los productos inyectables incluyen extractos de timo (Timoptina, Tactipina, Timalina), Polioxidonio, Timogen, Inmunofano, Neovir y Cicloferón.

- El efecto positivo de muchos de tales medicamentos puede atribuirse a la mejora de la resistencia general del cuerpo y a su inmunidad no específica, o a la activación de tipos específicos de células inmunitarias, así como a la activación de respuestas inmunitarias específicas. Estos productos se colocan como fármacos profilácticos y antivíricos. Sin embargo, la eficacia de la mayoría de los productos inmunotrópicos es relativamente baja, y los productos de este grupo no superaron significativamente el valor umbral del 30% en experimentos con animales válidos que investigan su efecto protector sobre modelos animales de infecciones víricas letales, en contraste con productos específicos, tales como inhibidores de la neuraminidasa de la gripe, que presentan índices protectores del 70% y superiores. Adicionalmente, las eficacias que exhiben en los ensayos clínicos no son sustancialmente mayores que las de los grupos de control, ya sea sin tratar o tratados usando terapias estándar, que consumen gran cantidad de criticidad.
- Los productos antivíricos químicos contra el virus de la gripe, tales como los inhibidores de la neuraminidasa oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza), no se usan para la profilaxis debido a efectos secundarios.
- Un punto importante en la dinámica del desarrollo de la enfermedad es la transición desde la fase de infección, cuando el patógeno vírico se embebe firmemente en la mucosa de la garganta, al descenso de la enfermedad a los bronquios y la tráquea y el desarrollo de una forma grave de la enfermedad. Las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad, tales como tos, fiebre, rinitis, etc., surgen durante este periodo. Como regla general, la transición de IRV a una forma grave es predictiva de una baja probabilidad de curación eficiente sin daño pulmonar a largo plazo e implicación de otros órganos. Los pacientes con una forma grave de la enfermedad se enfrentan naturalmente al mayor riesgo de muerte. Para prevenir el desarrollo de complicaciones graves de las IRV se utilizan varios enfoques: Fármacos antivíricos, en particular los inhibidores de la neuraminidasa oseltamivir (Tamiflu) y zanamivir (Relenza) en el caso del virus de la gripe. Considerando la implicación secundaria frecuente de la flora bacteriana, se administra terapia antibacteriana, y la elección del antibiótico que está siendo informado por la afección del paciente [8].
- Las soluciones de medicamentos administrados a través de un nebulizador, tales como broncodilatadores inhalados y productos antiinflamatorios, se usan para ejercer un efecto local directamente sobre el tejido pulmonar [9].
- Sin embargo, estos métodos de tratamiento tienen sus propias limitaciones. Los antivíricos dirigidos son agentes químicos que inhiben específicamente etapas particulares de la replicación vírica y normalmente tienen un espectro bastante estrecho. Los fármacos antiinflamatorios y broncodilatadores mejoran la calidad de vida de los pacientes pero en su mayoría ofrecen solo tratamiento sintomático, y no afectan significativamente a la causa subyacente: Carga vírica y complicaciones bacterianas concomitantes.
- La administración de Dalargina, un producto inmunotrópico, como solución nasal se conoce como un tratamiento de las IRV [23] y como un tratamiento contra la neumonía administrado por inyección o infusión [10]. OZBEJ ZUPANCIC ET AL: EN "Development and in vitro characterization of self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for oral opioid peptide delivery", JOURNAL DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY, vol. 43, no. 10, 4 de julio de 2017 (2017-07-04), páginas 1694-1702, se describe una administración oral de Dalargina incorporada en un sistema de administración de fármacos autoemulsionante.
- La Dalargina fue aprobada para uso clínico para el tratamiento de la enfermedad ulcerosa péptica durante la fase de exacerbación, la pancreatitis aguda, la pancreatitis necrotizante aguda, la enfermedad arterial ocluyente de las extremidades inferiores como parte de la terapia de combinación y alcoholismo. Dosis: Una dosis única para infusión IV durante el tratamiento de la pancreatitis necrotizante aguda corresponde a 5 mg de Dalargina. Las infusiones se llevan a cabo 3-4 veces al día a intervalos iguales. El curso del tratamiento es de 2 a 6 días. Por ejemplo, los documentos SU 1 475 670 A1 y RU 2 436 588 C1 describen el uso de Dalargina para tratar la úlcera duodenal y/o la pancreatitis.
- El Dalargina tiene una amplia ventana de seguridad y es una sustancia de baja toxicidad, con una LD₅₀ de 2,5 g/kg. La aplicación a la piel o las mucosas en cualquier concentración no produce irritación local.
- La Dalargina también mejora la microcirculación y el drenaje linfático en el área afectada [11, 12] y muestra un efecto antivírico e inmunoestimulante directo [23].
- El análogo más cercano de la invención reivindicada es la aplicación de una composición medicinal nasal que contiene el hexapéptido tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina o su sal farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de infecciones respiratorias víricas (IRV), como se describe en el documento EP 3 556 377 A1 (Patente RU2672888). Se demostró que el hexapéptido mostraba un efecto antivírico directo. La aplicación de la composición propuesta en forma de aerosol nasal permite usarla como monoterapia o en combinación con otros medicamentos como producto para el tratamiento y la prevención de las IRV, en particular de la gripe. Sin embargo, el método descrito de aplicación del hexapéptido implica la irrigación de las fosas nasales solamente. Esto no permite crear un efecto de barrera antivírica a través de toda la mucosa oral, orofaríngea y nasofaríngea y bloquea completamente el "portal de entrada". Adicionalmente, con el fin de asegurar la estabilidad durante el almacenamiento durante el uso, la composición tiene que contener un inhibidor del crecimiento microbiano, tal como cloruro de benzalconio, normalmente en el intervalo de concentraciones de 0,005% a 0,1%. Además del efecto bactericida, que permite el almacenamiento a largo plazo de viales de la solución, el cloruro de benzalconio, un componente de la formulación, exhibe un efecto local antibacteriano y antivírico sustancial con respecto a los virus de la gripe y los coronavirus cuando la formulación se usa en una forma inhalada o como pulverización [24].

Para resumir lo anterior, se puede afirmar que las publicaciones actualmente disponibles no describen la aplicación del principio activo, el hexapéptido Dalargina, como producto para crear el efecto de una barrera a la entrada de infección vírica a través de toda la superficie de la cavidad oral, la nasofaringe y la orofaringe, o su uso como el componente activo que previene el desarrollo de complicaciones de infecciones respiratorias agudas, en particular, aquellas de origen poco claro. Tampoco se describe el uso de la forma inhalada del producto para estos fines.

El objetivo de esta invención es expandir la gama de aplicaciones de diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina, denominado en lo sucesivo Dalargina, en la prevención de contraer infecciones respiratorias agudas de origen vírico y en la prevención de complicaciones.

Para resolver este problema, se propone utilizar Dalargina en forma de pulverización y/o inhalada para la prevención de las IRV o para la prevención de sus complicaciones. El problema se resuelve mediante diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en forma de pulverización y/o en una forma inhalada para la prevención de infecciones respiratorias víricas o para la prevención de sus complicaciones mediante administración en forma de pulverización para irrigar las fosas nasales, la nasofaringe, la orofaringe y la cavidad oral y/o mediante inhalación.

En una realización particular de la invención, la Dalargina se usa como un componente de una composición que se administra como una pulverización y/o como una solución de inhalación.

En una realización particular de la invención, la solución de Dalargina se usa para la prevención de IRV mediante inhalación y/o como una pulverización con un tamaño de partícula de 5-50 μm .

En una realización particular de la invención para la protección contra la contracción de las IRV, la solución de Dalargina se usa para irrigar toda la superficie de la nasofaringe, la orofaringe, la cavidad oral y se aplica sublingualmente, bajo la lengua, para crear un efecto de barrera protectora sobre las membranas mucosas.

En una realización particular de la invención, la solución de Dalargina se usa para la prevención de complicaciones de las IRV mediante inhalación con un tamaño de partícula de 0,5 - 10 μm , preferiblemente 0,5 - 3 μm .

En una realización particular de la invención, la composición que contiene hexapéptidos, que se administra en forma de solución para pulverizar y/o inhalar, contiene un inhibidor del crecimiento microbiano, tal como cloruro de benzalconio, normalmente en el intervalo de concentraciones de 0,005 a 0,1% en peso, preferiblemente 0,01%.

En una realización particular de la invención, la composición tiene un pH ácido en el intervalo de 3 a 7, preferiblemente pH = 4,0-5,5.

En una realización particular de la invención, la composición que contiene hexapéptidos, que se administra en forma de solución para pulverizar y/o inhalar, contiene tampón acetato.

Los resultados técnicos de la invención reivindicada son:

- Expansión del kit de herramientas técnicas de productos para terapia por inhalación para la profilaxis de las IRV o la prevención del desarrollo de complicaciones;
- Logro de concentraciones terapéuticas directamente en los tejidos que están expuestos a virus, incluyendo la nasofaringe, la laringe, la tráquea, los bronquios, los alvéolos, que produce una respuesta local rápida y activa en forma de actividad antivírica aumentada específicamente en el sitio de la infección.
- Logro de reacciones positivas causadas indirectamente, tales como efecto antitusivo y disnea reducida;
- Logro de la estabilización de pacientes con formas leves o moderadas de IRV, en particular cuando se agravan con complicaciones de origen vírico y/o bacteriano y efectos de hiperactivación patológica local de la respuesta inmunitaria;
- El producto demostró una alta eficacia contra diferentes tipos de virus, que era comparable a fármacos antivíricos dirigidos específicos, tales como Oseltamivir, en ensayos con animales;
- El tamaño de partícula de la sustancia farmacéutica en aerosol varía en un amplio intervalo, de 0,5 μm a 50 μm , lo que produce tanto un efecto protector profiláctico (la irrigación del tracto respiratorio superior es suficiente para la profilaxis; el tamaño de partícula asociado es relativamente grande: 5-50 μm) como un efecto terapéutico (la prevención de complicaciones necesita actuar sobre regiones más profundas, que son accesibles a partículas más finas, 0,5-3 μm).
- Como dosis inhalada recomendada, los presente inventores proponen usar una solución de 0,005-0,5% de Dalargina en solución tampón con un pH en el intervalo de 3 a 7, preferiblemente pH = 4,0-5,5, siendo una dosis única de 0,5 a 50 mg en una composición con tampón acetato. Se demostró que la eficacia antivírica e inmunotrópica de la forma de pulverización y la forma de inhalación de Dalargina se reduce significativamente en soluciones con un pH por encima de 6 o con tampones distintos del acetato.

Las ventajas de la forma de inhalación de la Dalargina incluyen su efecto altamente específico sobre el órgano diana y una duración del efecto ampliamente extendida cuando se administra a través de los pulmones en relación con la administración sistémica. Cuando se administra por inyección o infusión, la semivida de eliminación media de la Dalargina es de 12 minutos [13]. La eliminación se produce por degradación rápida del péptido en el hígado y el torrente sanguíneo. La forma inhalada, a pesar de las pérdidas sustanciales asociadas con este modo de administración, permanece en la forma activa sobre la superficie de la mucosa traqueal y bronquial durante un tiempo mucho más largo y muestra un efecto terapéutico directo.

Como la Dalargina es un péptido, después de la administración es rápidamente degradado por peptidasas a oligopéptidos y aminoácidos, que luego son reutilizados en la síntesis de las propias proteínas del organismo [14]. En este caso, después de que se administra sistémicamente un producto de Dalargina, se degrada rápidamente y disminuye su eficacia en órganos diana. La administración de la forma de dosificación inhalada permite que se consiga la concentración de trabajo máxima del producto específicamente en el órgano diana y se mantenga durante un largo periodo. Si la sustancia activa se administra a través de la mucosa bronquial y de la garganta y los tejidos pulmonares, actúa sobre las poblaciones locales de células inmunitarias, tales como leucocitos y macrófagos.

El proceso de degradación del péptido Dalargina (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) implica la escisión del aminoácido C-terminal, que produce el péptido de cinco miembros Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu con una afinidad considerable por los receptores delta. El siguiente metabolito, el tetrapéptido Tyr-D-Ala-Gly-Phe, presenta afinidad por los receptores mu. Los receptores mu y delta se encuentran en el centro de la tos de la médula, y la aplicación sistémica de antagonistas de estos receptores inhibe el reflejo de la tos. Esto afecta también usualmente a otros órganos y zonas del cerebro que contienen receptores opioides. Adicionalmente, puesto que los receptores de este grupo se encuentran en rutas neurales periféricas, la Dalargina también puede afectar a la conducción de señales a lo largo de estas rutas neurales [15]. La inhalación de Dalargina produce principalmente efectos locales de metabolitos de vida corta del péptido sobre receptores opioides periféricos, que se manifiesta por sí misma en respuesta reducida de células receptoras a la estimulación y reducción de la intensidad de la señal transmitida al centro de la tos. Esto da como resultado una menor gravedad de la tos durante 2-4 horas, siempre que la Dalargina permanezca en los tejidos mucosos del pulmón a una concentración particular. Este efecto no implica al centro respiratorio. Un cierto efecto analgésico local también mejora el estado general del paciente. De hecho, los ensayos clínicos mostraron que los pacientes informaron de una mejora sustancial de la respiración y el alivio o eliminación de la tos, normalmente tos seca. Esto, a su vez, alivia la irritación del tracto respiratorio, reduce la pérdida del producto inhalado debido a la tos y mejora la calidad de vida del paciente.

La disnea es uno de los síntomas más comunes de las IRV. El paciente a menudo es incapaz de realizar las acciones más básicas sin experimentar disnea, jadeo y una sensación de falta de aire. Las descripciones de diversos métodos de tratamiento de la disnea informan de efectos positivos de la administración sistémica de ciertos agonistas de receptores opioides. Una variedad de opioides administrados en forma inhalada mostraron un efecto positivo en la mayoría de los estudios [16]. Los opioides administrados sistémicamente también se recomiendan para tratar la disnea en tales pacientes, pero los efectos secundarios pueden limitar su uso. A pesar del efecto positivo, los usos de tales terapias están gravemente limitados debido a los efectos secundarios típicos y las restricciones en las ventas de fármacos opioides. La inhalación de Dalargina está adicionalmente asociada con una mejor calidad de la respiración. El uso clínico en investigación del fármaco redujo significativamente la disnea y se asoció con "la ralentización de la respiración". Un presunto mecanismo por el cual podría ocurrir este efecto se basa en efectos locales a corto plazo de metabolitos de la Dalargina, que hasta cierto grado exhiben propiedades de agonistas de receptores mu y delta. A diferencia de los opioides clásicos, estos metabolitos tienen una vida corta y sólo actúan localmente, en la zona en donde el aerosol inhalado se deposita en los pulmones, predominantemente en la laringe, los bronquios y la tráquea.

Por lo tanto, la Dalargina en una forma inhalada o en forma de pulverización puede exhibir un efecto antivírico directo, ayuda a aliviar la tos y reducir los efectos negativos asociados con la disnea en pacientes con IRV y evita el desarrollo de complicaciones y la transición de la enfermedad a una forma grave; adicionalmente, el uso de Dalargina en forma de pulverización para irrigación simultánea de la cavidad oral, la nasofaringe, la orofaringe y el área sublingual ofrece una protección significativa contra contraer IRV.

Los estudios llevados a cabo por los autores de la presente invención demostraron que los efectos de la Dalargina - en particular el efecto antivírico directo, la activación de la inmunidad mediada por células y el "efecto barrera", la capacidad para potenciar los factores de la inmunidad local y sistémica, reducir la tos y aliviar la dificultad de respirar - permiten que se use como un producto terapéutico eficaz para la prevención de las IRV y sus complicaciones.

El Dalargina activa las respuestas inmunes y antiestrés del organismo del paciente, que son universales en la naturaleza y se desencadenan durante las infecciones víricas independientes del patógeno específico.

Breve descripción de los materiales explicativos

Tabla 1. Propiedades inhibitoras de virus de la Dalargina con respecto al virus de la gripe y adenovirus de ser humano en cultivo celular.

Tabla 2. Estadísticas de mortalidad animal debida a neumonía letal por gripe causada por el virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Comentario: * Diferencias estadísticamente significativas del grupo control ($p < 0,05$).

Tabla 3. Estadística de supervivencia de animales en un modelo de neumonía letal por gripe causada por el virus de la gripe A/California/04/2009. Comentario: ** Diferencias estadísticamente significativas del grupo control activo ($p < 0,05$) (Ingavirina).

Fig. 1. Título del virus de la gripe A/California/04/2009 en los pulmones de ratones infectados 5 días después de la exposición. Comentario: Las barras de error representan el intervalo de confianza del 95%.

Divulgación del carácter técnico de la invención

La forma inhalada del producto puede prepararse como una solución estéril con una concentración de Dalargina al 0,005-0,5% en solución tampón, preferiblemente tampón acetato, con un valor de pH de 3 a 8, preferiblemente pH = 4,0-5,5, siendo una dosis única de 0,5 a 50 mg en 5-20 mL de la solución. La solución de Dalargina se administra a través de un nebulizador compresor (que incluye modelos fabricados por Med2000, Omron, B. Well, etc.), siendo el intervalo de tamaño recomendado de las partículas generadas de 0,5-10 μm , preferiblemente de 0,5-3,0 μm . Este tamaño de partícula específico asegura la administración más completa del ingrediente activo al tracto respiratorio medio e inferior.

El producto se suministra al tracto respiratorio superior como una pulverización con un tamaño de partícula de 5-50 μm .

A la formulación de la solución se pueden añadir excipientes adicionales, tales como componentes de sales tampón, estabilizantes, espesantes, tensioactivos farmacológicamente aceptables, sales fisiológicas y conservantes.

El tipo preferido de sales tampón es tampón acetato, que contiene acetato sódico y ácido acético, con un valor de pH preferido de 4,0-5,5. También se puede usar tampón citrato. Nuestros estudios mostraron que el bajo pH de la solución tampón basada en acetato asegura una actividad antiviral e inmunotrópica específica de la Dalargina 2-4 veces mayor cuando se administra en la nariz, la nasofaringe, la orofaringe, la cavidad oral o se usa sublingualmente para fines profilácticos o terapéuticos y profilácticos. Esto asegura un efecto más estable cuando se administran dosis más bajas del fármaco (1-4 mg por dosis). Además, se puede usar un tampón fisiológicamente activo basado en hidrogenofosfato de sodio dihidrato y dihidrogenofosfato de sodio dihidrato; sin embargo, este tampón no es suficientemente eficaz en el intervalo de pH de 4,0 a 5,5 en términos de su capacidad tamponante.

Con el fin de asegurar una vida útil suficientemente larga de la solución en un dispensador de pulverización y después del inicio del uso, la solución debe contener cloruro de benzalconio, un componente bactericida, normalmente en el intervalo de concentraciones de 0,005% a 0,1%.

También se pueden añadir como estabilizantes componentes tales como edetato disódico dihidrato (0,1-2 mg/mL) y cloruro sódico (1-10 mg/mL). Estos aditivos pueden prolongar potencialmente la vida útil de las soluciones y los polvos liofilizados que contienen el componente activo Dalargina. Adicionalmente, se usa cloruro de sodio como componente que da a la solución propiedades isotónicas.

La viscosidad de la solución puede ser importante para la administración de la solución de Dalargina en forma de pulverización. Como reguladores de viscosidad pueden usarse excipientes tales como celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa de sodio, macrogol, propilenglicol, glicerol, polivinilpirrolidona y N-metilpirrolidona.

Para mejorar la adhesión de la solución de pulverización a las membranas mucosas se pueden usar diversos polímeros con propiedades bioadhesivas, tensioactivos o detergentes no iónicos con propiedades mucoadhesivas, tales como poloxámeros.

Para la aplicación estándar en un nebulizador, la cámara del nebulizador se carga con 5-10 mL de solución de Dalargina al 0,02-0,2% y se conecta al compresor de un nebulizador. Una máscara o boquilla se une a la cámara con el fármaco. A continuación se pone en marcha el compresor y la máscara se aplica firmemente a la cara para asegurarse de que se produce respiración a través de la nariz y la boca. Si se utiliza una boquilla, se coloca en la boca y se sujeta firmemente con los labios. La frecuencia respiratoria debe estar tranquila, los movimientos inspiratorios deben ser profundos y suaves.

La inhalación se lleva a cabo durante 2-15 minutos 2-3 veces al día. La dosificación preferida del fármaco por sesión de inhalación puede ser de 1 a 6 mg, que es suficiente para que el fármaco exhiba sus principales efectos. En caso de terapia de IRV moderadas, la cantidad del principio activo puede ser tan alta como 50 mg con inhalación prolongada (hasta 30 minutos).

Si la solución se usa en forma de pulverización, la solución preparada se coloca en un recipiente equipado con un pulverizador que produce partículas de 10-50 μm , las fosas nasales se irrigan con 1-2 chorros, y la cavidad oral se irriga con 2-3 chorros 2-3 veces al día. La concentración preferida del fármaco en la solución de pulverización puede ser del 0,05 al 0,5% de Dalargina.

Realización de la invención

Ejemplo 1. Preparación de solución de inhalación de Dalargina al 0,05%

La solución de inhalación de Dalargina se prepara en salas limpias. La concentración terapéutica óptima de Dalargina para inhalación con fines de prevención y control de complicaciones en las etapas iniciales de las IRV es del 0,05%. En este caso, el volumen inhalado óptimo puede ser de 4 a 10 mL, lo que corresponde a 2-5 mg de Dalargina por procedimiento de inhalación.

- 5 Para la preparación de 10 L de la solución de inhalación se utiliza el siguiente procedimiento. Se prepara un concentrado de tampón acetato mezclando 490 mL de una solución de acetato sódico 0,2 M y 510 mL de ácido acético 0,2 M. Este es un concentrado de 10 veces con relación a la solución final, que tiene que contener 0,005-0,05 M de tampón acetato, preferiblemente 0,02 M. El valor del pH del concentrado tiene que estar en el intervalo de 4,3 a 4,8. Si es necesario, se ajusta el pH añadiendo una solución 1 M de acetato sódico o ácido acético 1 M. Se coloca 1 L del concentrado de tampón acetato en un reactor agitado. Se añaden 7 L de agua para inyecciones. La solución tampón también se puede preparar sobre la base de citrato sódico usando un procedimiento similar, pero es preferible el tampón acetato.

- 15 Para preparar una solución de Dalargina al 0,05% para inhalación se utilizan 5000 mg de polvo liofilizado de Dalargina. Si el API se usa en forma líquida, se toma la cantidad de la solución de API equivalente a 5000 mg de polvo seco de Dalargina. Por ejemplo, en el caso de API líquido al 10%, se toman 50 mL de solución de API. Se mezclan los componentes en un reactor agitado hasta que los componentes se hayan disuelto completamente. Se monitoriza el pH de la solución y se ajusta si es necesario añadiendo solución de acetato de sodio 1 M o ácido acético 1 M. Se lleva hasta 10 L y se detiene la mezcla. Se filtra la solución resultante por filtración frontal estéril y se llenan viales estériles de 5 o 10 mL, preferiblemente de vidrio ámbar u opaco. Este procedimiento, de manera similar a los ejemplos 2, 3 y 4 proporcionados anteriormente, se puede escalar al volumen requerido de solución de Dalargina teniendo en cuenta las características particulares de la instalación de producción farmacéutica específica.

La solución resultante se puede almacenar refrigerada durante un largo tiempo y se puede usar para inhalación sin manipulaciones adicionales. Se transfiere la cantidad requerida de la solución desde el vial a una cámara nebulizadora y se administra por inhalación.

- 25 Ejemplo 2. Preparación de solución de inhalación de Dalargina al 0,2%

Para prevenir complicaciones en pacientes con IRV moderadas pueden ser necesarias altas dosis de Dalargina. Esto requiere preparar una solución para inhalación de Dalargina al 0,2%.

- 30 Se prepara la solución tampón de manera similar al Ejemplo 1. Para preparar una solución de inhalación de Dalargina al 0,2%, se utilizan 20.000 mg de polvo liofilizado de Dalargina. Si se usa API líquido al 10%, se toman 200 mL. Se esteriliza la solución resultante y se llena la cantidad adecuada (preferiblemente 4-10 mL) en viales en condiciones asépticas.

Ejemplo 3. Preparación de solución de pulverización de Dalargina para irrigación de las membranas mucosas de la nariz y la garganta

- 35 La solución de Dalargina para la irrigación de la nasofaringe, la orofaringe, la cavidad oral y el área sublingual tiene una concentración de Dalargina de preferiblemente 0,05-0,4%. Como regla, una solución fabricada según los estándares de calidad aplicables, con pH controlado en el intervalo de 4 a 5, no requiere concentraciones por encima de 0,1-0,2% para exhibir suficiente actividad.

- 40 La solución se prepara en salas limpias. Para preparar 10 L de solución de Dalargina al 0,1% para administración por pulverización, se prepara un tampón acetato 0,02 M de manera similar al Ejemplo 1. Se añade 1 g de cloruro de benzalconio al recipiente reactor en forma de polvo o en forma de solución concentrada para lograr una concentración del 0,01% en la solución final. Para preparar una solución de Dalargina al 0,1% para administración por pulverización se usan 10.000 mg de polvo liofilizado de Dalargina. Si se usa API líquido al 10% se toman 100 mL. Se monitoriza el pH de la solución y, si es necesario, se ajusta a pH = 4-5 añadiendo solución de acetato de sodio 1 M o ácido acético 1 M. Se lleva hasta 10 L y se detiene la mezcla. Se filtra la solución resultante por filtración frontal estéril y se llenan viales estériles de 5 ó 10 mL, preferiblemente de vidrio ámbar u opaco, con un cabezal pulverizador.

Ejemplo 4. Preparación de una solución de pulverización de Dalargina al 0,3% de acción prolongada para irrigación de las membranas mucosas de la nariz y la garganta

- 50 La solución de pulverización según el Ejemplo 3 contiene el número mínimo de componentes para producir un efecto antivírico protector específico. La adición de componentes potenciadores de la viscosidad a la solución de pulverización asegura una retención más larga de la solución sobre las membranas mucosas, la liberación gradual de la solución y la duración prolongada del efecto. En la práctica clínica, esta versión de preparación de la solución de pulverización requiere una frecuencia de dosificación más baja.

- 55 Para preparar 10 L de solución de Dalargina al 0,3% para administración por pulverización, se prepara un tampón acetato 0,02 M de manera similar al Ejemplo 1. Se carga un recipiente reactor con 1 g de cloruro de benzalconio, 50 g de cloruro de sodio, 5 g de edetato de sodio, 100 g de poloxámero 407, 600 g de polietilenglicol 400, 600 g de propilenglicol, 30.000 mg de Dalargina o una cantidad equivalente de solución concentrada de API. Se mezclan

completamente los componentes en un reactor agitado hasta que los componentes se hayan disuelto completamente, preferiblemente usando un procedimiento de evacuación para desgasificar. Se monitoriza el pH de la solución y se ajusta si es necesario añadiendo solución de acetato de sodio 1 M o ácido acético 1 M. Se llevar hasta 10 L y se detiene la mezcla. Se filtra la solución resultante por filtración frontal estéril y se llenan viales estériles de 5 ó 10 mL.

- 5 La solución resultante se caracteriza por una consistencia relativamente viscosa que puede revestir eficazmente las membranas mucosas de la garganta y la cavidad oral, asegurando la absorción gradual del componente activo de Dalargina en los tejidos superficiales y asegurando una eficacia enormemente incrementada con respecto a las formulaciones sin este complejo de excipientes.

Ejemplo 5

- 10 La actividad antivírica de la Dalargina se determinó in vitro con respecto al virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) con respecto a Rimantadina (a una dosis de 5 µg/mL) y adenovirus 5 de ser humano con respecto a Aciclovir (a una dosis de 30 µg/mL). Se infectaron células de la línea celular correspondiente (MDCK para el virus de la gripe y Vero para adenovirus) con el virus a una multiplicidad de infección de 0,01 en presencia de Dalargina en el intervalo de concentraciones de 100 a 1 µg/mL. Se incubaron placas con las células durante 1 h, tras lo cual se retiró el virus no unido por lavado, se reemplazó el medio de cultivo con uno reciente, que contenía Dalargina a la misma concentración, y se incubaron las placas en un termostato durante 24 h. Al final de la incubación, se determinó el título de virus infeccioso mediante valoración en un cultivo celular permisivo. Para ello, se prepararon diluciones seriadas al décuplo (10^{-1} - 10^{-7}) del fluido de cultivo, estas diluciones se usaron para infectar células de la línea respectiva inoculada en placas de 96 pocillos, y las placas se incubaron a 36 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 h. Al final de este período, la presencia del virus en los pocillos se detectó por la presencia de un efecto citopatógeno específico (CPE) para adenovirus o por un ensayo positivo de hemaglutinación (HA) en el fluido de cultivo (virus de la gripe).

- 25 Para un ensayo de hemaglutinación (HA), se transfirieron 100 µL del fluido de cultivo a los pocillos respectivos de una microplaca inmunológica, seguido de un volumen igual de glóbulos rojos de pollo al 1% en solución salina. Las placas se incubaron a 20 °C durante 1 h. Al final de este período, los resultados de HA se evaluaron en los pocillos mediante inspección visual.

Los resultados de los ensayos de la actividad antivírica de la Dalargina contra el virus de la gripe y adenovirus de ser humano en cultivos celulares se proporcionan en la Tabla 1.

Las diferencias con un valor de p inferior a 0,05 se consideraron estadísticamente significativas.

Los siguientes parámetros se calcularon en base a los datos recogidos:

- 30 • Concentración citotóxica media (CC₅₀), es decir, la concentración del compuesto que reduce la absorbancia en los pocillos en un factor de dos con respecto a las células control;
- Unidades de título: la unidad de título del virus fue el logaritmo decimal negativo de la dilución máxima del virus capaz de producir una reacción de hemaglutinación positiva (virus de la gripe) o un CPE específico (adenovirus), es decir, la dosis infecciosa de cultivo tisular del virus del 50% (TCID₅₀);
- 35 • El título vírico se expresó en logaritmos decimales de su concentración en el material en las unidades de título apropiadas;

IC₅₀ es la concentración eficaz (es decir, inhibidora del virus) media de la sustancia;

SI, el índice de selectividad de la sustancia, es la relación de la concentración tóxica (CC₅₀) a la concentración eficaz (IC₅₀).

- 40 De los resultados se deduce que los virus modelo se multiplicaron eficazmente en los cultivos de tejido, y los títulos de virus después de 24 h de cultivo alcanzaron un valor de 5,5 (virus de la gripe) o 4,5 (adenovirus) lg TCID₅₀/0,1 mL. Los fármacos de referencia Rimantadina y Aciclovir no exhibieron propiedades antivíricas, ya que los virus seleccionados fueron insensibles a estos fármacos.

- 45 Al mismo tiempo, la Dalargina dio como resultado una reducción dependiente de la dosis de la actividad infecciosa de ambos virus. Este efecto fue más pronunciado para el virus de la gripe (IC₅₀ = 0,8 µg/mL, SI > 37,5) y algo menos pronunciado para el adenovirus (IC₅₀ = 2,5 pg/mL, SI = 12).

Por lo tanto, los resultados del ensayo in vitro confirmaron que la Dalargina exhibe un efecto inhibidor de virus.

- 50 Ejemplo 6. Evaluación in vivo de la actividad antivírica de la Dalargina administrada por inhalación como régimen terapéutico/preventivo o puramente preventivo en un modelo de neumonía por gripe en ratones con respecto a una cepa relevante del virus de la gripe (A/Puerto Rico/8/34 (H1N1))

Descripción del modelo in vivo. El estudio se llevó a cabo usando 297 ratones Balb/c hembra con un peso corporal promedio de 25 ± 4,6 g. Téngase en cuenta las diferencias entre especies de las características de respiración es

especialmente importante para la vía inhalada de administración en modelos animales [14, 15, 16]. A pesar del hecho de que varios investigadores sugieren usar la administración intratraqueal directa de soluciones farmacológicas (principalmente como parte de estudios toxicológicos), este enfoque evidentemente no es bastante adecuado para modelos terapéuticos. Cuando se modela el efecto terapéutico de los fármacos administrados por inhalación, tiene

que emularse una vía de administración similar en animales. Sin embargo, en este caso se requiere una determinación y normalización precisas de la función respiratoria para calcular las dosis recibidas por los animales.

La función respiratoria experimenta cambios drásticos dependiendo del estado fisiológico (por ejemplo, en reposo o durante el estrés), que afecta invariablemente a sus características [16]. Adicionalmente, diferentes líneas de ratones también difieren sustancialmente en parámetros del sistema respiratorio tales como la frecuencia respiratoria, el volumen respiratorio y el volumen minuto respiratorio [15]. Además, tiene que tenerse en cuenta la proporción del fármaco que llega al tracto respiratorio inferior, ya que es el factor decisivo de la actividad farmacológica; mientras tanto, depende de varios parámetros (tales como el tamaño de partícula del aerosol) y, en consecuencia, de los valores de ventilación usados en el modelo.

Para calcular la dosis absorbida en el tracto respiratorio inferior (DosisAbsorb) en este experimento se usó:

$$DoseAbsorb(mg/kg) = \frac{ConcSol \left(\frac{mg}{mL} \right) * Vneb \left(\frac{mL}{min} \right) * tiempo(min) * RatioAbsorb * m(kg) * V \left(\frac{L}{kg} * min \right)}{Flujo \left(\frac{L}{min} \right) * 1 min}$$

donde ConcSol (mg/mL) es la concentración en solución, Vneb (mL/min) es el caudal de generación de aerosol (0,3 mL/min), tiempo (min) es la duración de la exposición de los animales en la cámara, RatioAbsorb es la retención alveolar (la proporción de partículas de aerosol depositadas en los pulmones; se determina mediante el tamaño de partícula y se supone igual al 7,3% basándose en los datos obtenidos en los ensayos preliminares [14]); m (kg) es el peso de los animales (25 g), V (L/kg·min) es el volumen minuto respiratorio (1 L/kg·min); Flujo (L/min) es el caudal de aire a través de la cámara (17 L/min).

Materiales y métodos. Para administrar inhalaciones, los ratones se colocaron en una cámara de vidrio acrílico de 14,5 L, 18 animales en una cámara. La cámara estaba equipada con dos ruedas para correr para evitar que los animales se amontonaran y permitir que se movieran.

Para convertir las soluciones en una forma inhalada se usó un nebulizador SideStream; el nebulizador produce partículas de 0,5-3 µm a una presión de 3 atmósferas y un caudal de 17 L/min. La solución se transformó en aerosol a un caudal de 0,3 mL/min.

Para el tratamiento por inhalación, se disolvió Dalargina en agua bidestilada hasta una concentración final del 1%, 3% y 5%. Las dosis para los ratones se calcularon mediante retroconversión de las siguientes dosis equivalentes para ser humano (HED): 1, 20 y 40 mg/día.

La dosificación se controló ajustando la concentración de la solución de inhalación y la duración de la exposición del animal en la cámara.

Los animales se aleatorizaron a través de 9 grupos de 33 animales cada uno (30 animales para evaluación de la mortalidad y 3 animales para eutanasia el día 3):

Grupo 1 (control: inhalación de solución salina dos veces al día);

Grupo 2 (Tamiflu™ a una dosis de 20 mg/kg una vez al día por vía intragástrica);

Grupo 2 (Kagocel® a una dosis de 12 mg/kg una vez al día por vía intragástrica);

Grupo 4 (inhalación de solución de Dalargina al 1% durante 14 minutos dos veces al día). La dosis recibida (la dosis que alcanzó los alveolos) fue de 0,36 mg/kg. La HED corresponde a 2 mg/kg;

Grupo 5: Los ratones recibieron inhalaciones de solución de Dalargina al 3% durante 45 minutos dos veces al día. La dosis única recibida (la dosis que alcanzó los alveolos) fue de 1,74 mg/kg. La HED diaria corresponde a 20 mg/kg;

Grupo 6: Los ratones recibieron inhalaciones de solución de Dalargina al 5% durante 55 minutos dos veces al día. La dosis única recibida (la dosis que alcanzó los alveolos) fue de 3,54 mg/kg. La HED diaria corresponde a 40 mg/kg.

Grupo 7: Los ratones recibieron un régimen profiláctico de Kagocel® a una dosis de 12 mg/kg por vía intragástrica una vez al día los días 3, 2, 1 y 1 hora antes de la exposición.

Grupo 8: Los ratones recibieron inhalaciones de solución de Dalargina al 3% durante 45 minutos dos veces al día los días 3, 2 y 1 y 1 hora antes de la exposición; no se administró ningún tratamiento adicional después de la exposición.

- 5 Grupo 9: El producto se administró por vía nasal y se aplicó pulverizando sobre la pared posterior de la faringe (pulverización faríngea, PS) a una dosis de 0,5 mg/kg (como 5 µL de solución al 0,2% y 10 µL de solución al 0,1%) dos veces al día los días 3, 2 y 1 y 1 hora antes de la exposición; no se administró ningún tratamiento adicional después de la exposición.

Los animales se expusieron bajo anestesia con éter. Los ratones se expusieron a una cantidad de virus de $2,5 \times 10^3$ EID₅₀ por animal administrada como 0,025 mL de material que contiene virus por fosa nasal.

- 10 Los productos de referencia administrados con fines profilácticos y terapéuticos se administraron por vía intragástrica a las 24 h (Kagocel®) y 1 h (Tamiflu™, Kagocel®) antes de la exposición y durante 5 días después de la exposición. Las inhalaciones de Dalargina administradas con fines profilácticos y terapéuticos (grupos 3, 4 y 5) se administraron diariamente, una o dos veces al día durante 6 días (24 h y 1 h antes de la exposición y durante 5 días después de la exposición). Como tratamiento preventivo, el grupo 7 recibió el fármaco comparador Kagocel® a una dosis de 12 mg/kg por vía intragástrica una vez al día los días 3, 2, 1 y 1 hora antes de la exposición. Como régimen profiláctico, el grupo 15 8 recibió inhalaciones de solución de Dalargina al 3% durante 45 minutos dos veces al día, y el grupo 9 recibió Dalargina nasalmente y como una pulverización aplicada a la pared posterior de la faringe (pulverización faríngea, PS) a una dosis de 0,5 mg/kg (como 5 µL de solución al 0,2% y 10 µL de solución al 0,1%) una vez al día los días 3, 2 y 1 y 1 hora antes de la exposición; no se administró ningún tratamiento adicional después de la exposición.

- 20 Como criterios de valoración de la eficacia primaria se usaron los siguientes parámetros:

Mortalidad (%): Relación del número de animales muertos con respecto al número total de animales infectados en el grupo: $M\% = M/Nt$, donde M es el número de animales muertos, y Nt es el número de animales infectados.

- Índice protector (%): Relación de la diferencia en el porcentaje de mortalidad en los grupos control y experimental al porcentaje de mortalidad en el grupo control: $PI = ((Mc - Me) / Mc) \times 100\%$, donde Mc es la mortalidad del grupo control y Me es la mortalidad del grupo experimental.
- 25

La supervivencia se evaluó usando el método de Mantel-Cox ajustado para comparaciones múltiples, se representaron gráficamente las curvas de Kaplan-Meier usando IBM SPSS v. 22.0.

Resultados

- 30 Los signos clínicos de enfermedad en ratones infectados fueron típicos de infecciones por gripe. Incluyeron dificultad para respirar, ataxia, temblor y consumo reducido de alimento y agua. No hubo mortalidad no específica en el grupo control, que consistía en animales intactos. Los datos sobre las estadísticas de mortalidad en los grupos control y experimental se resumen en la Tabla 2.

Se sacrificaron tres animales de cada grupo (para un total de n = 6) los días 3 y 12 del experimento con el fin de evaluar las características histológicas del tejido pulmonar.

- 35 En los 3 días después de la estimulación, los animales de control desarrollaron edema intersticial pronunciado; las observaciones también revelaron áreas de edema hemorrágico, infiltración neutrófila y alveolos colapsados con exudado seroso en sus luces. Estos fenómenos son indicativos del síndrome de dificultad respiratoria aguda. Se observó un patrón similar en los grupos 3 y 7 y parcialmente en el grupo 9. Los fármacos de comparación no lograron demostrar un efecto significativo sobre las características histológicas. Estos cambios fueron mucho menos pronunciados en los grupos que recibieron Dalargina. En los grupos 8 y 9, en los cuales se usó Dalargina de manera preventiva, algunos de los animales no mostraron signos de patología y no exhibieron los rasgos histológicos característicos de la infección.
- 40

- El día 12, los animales supervivientes en el grupo control presentaron hiperplasia del epitelio bronquial, exudado celular en la luz bronquial e infiltración celular intensa. Estos cambios fibróticos frecuentemente subyacen a la fibrosis pulmonar, una complicación común de la gripe. El uso de fármacos comparadores se asoció con cambios inflamatorios menos pronunciados. La mitad de los animales que recibieron Dalargina no mostró signos de patología en las características histológicas del tejido pulmonar, lo que indica que el fármaco tiene un efecto pronunciado cuando se administra por inhalación. Otros animales supervivientes que recibieron Dalargina como régimen terapéutico/preventivo exhibieron signos patomorfológicos muy leves. En los grupos 8 y 9, en los cuales se usó Dalargina de manera preventiva, casi todos los animales supervivientes no mostraron signos de patología y no mostraron los rasgos histológicos característicos de la infección.
- 45
- 50

- Por lo tanto, se demostró actividad antivírica máxima para la inhalación de Dalargina, cuyo efecto protector con respecto al tejido pulmonar y la función pulmonar fue superior al de Tamiflu y Kagocel. La Dalargina administrada por inhalación dio como resultado la mortalidad animal más baja y redujo al mínimo el daño en el tejido pulmonar debido a los efectos inmunomoduladores del fármaco y a la resistencia celular mejorada a la infección vírica. Con la
- 55

administración preventiva de Dalargina, los animales supervivientes no fueron infectados, y el fenómeno de protección antivírica se debía a la acción profiláctica eficaz de Dalargina en forma de efecto antivírico directo y activación de la inmunidad local mediada por células en el "portal de entrada": La nariz, la nasofaringe, la orofaringe y la cavidad oral, y, en el caso de inhalación, adicionalmente los bronquios y la tráquea. La eficacia atribuida exclusivamente al efecto protector profiláctico sin el componente terapéutico es del 50%.

El análisis de supervivencia para diferentes dosis de Dalargina demostró que la tasa de supervivencia aumenta con la dosis hasta un cierto valor máximo, que corresponde a una curva de dosis-respuesta sigmoidea.

Ejemplo 7. Evaluación in vivo de la actividad antivírica de Dalargina administrada como régimen terapéutico o preventivo en un modelo de neumonía por gripe en ratones con respecto a una cepa pandémica de virus de la gripe A (H1N1) pdm09 (A/California/04/2009)

Materiales y métodos. Un estudio previo de la actividad antivírica de la Dalargina en un modelo de neumonía por gripe en ratones demostró que la administración intranasal no es inferior a la administración intramuscular. Mientras tanto, el grupo que recibió el fármaco mediante una combinación de administración intranasal y aplicación de pulverización a la pared posterior faríngea (PS) mostró mejores estadísticas de supervivencia que el grupo que recibió el fármaco exclusivamente por vía intranasal. El efecto máximo en este estudio se observó para el intervalo de dosificaciones de 0,2-0,5 mg/kg y el intervalo de concentraciones de 0,08-0,1%, respectivamente [17]. Estos resultados impulsaron el siguiente estudio, que se basó en la suposición de que la vía de administración por inhalación puede potenciar la eficacia del fármaco y emerger como el objetivo preferido de desarrollo.

El modelo de administración por inhalación se basó en los cálculos proporcionados en el Ejemplo 6.

La cepa A/California/04/2009, que se aisló por primera vez en los Estados Unidos en 2009 y se adaptó a ratones, fue proporcionada por el Instituto de Investigación de la Gripe A.A. Smorodntsev del Ministerio de Salud de Rusia. Como fármacos de comparación (control activo) se utilizaron Ingavirina® y Arbidol®. Los fármacos de comparación se administraron por vía intragástrica a dosis de 0,2 mL según el régimen terapéutico (a las 24, 48, 72, 96 y 120 h después de la exposición).

Los animales se aleatorizaron a través de 10 grupos de 33 animales cada uno (30 animales para evaluación de mortalidad y 3 animales para ser sacrificados el día 5) (para un total de $n = 330$):

Grupo 1 (control): Inhalación de solución salina dos veces al día durante 6 días (a las 24 h y 1 h antes de la exposición y durante 5 días después de la exposición);

Grupo 2 (Ingavirina® a una dosis de 15 mg/kg intragástricamente una vez al día);

Grupo 3 (Arbidol® a una dosis de 130 mg/kg intragástricamente una vez al día);

Grupo 4 (Dalargina nasalmente una vez al día a una dosis de 0,2 mg/kg, concentración 0,08%, 10 µL por vía de administración)

Grupo 5 (Dalargina, nasalmente y aplicada a la pared posterior faríngea (PS) una vez al día a una dosis de 0,5 mg/kg, concentración 0,1%, 10 µL por vía de administración)

Grupo 6 (inhalación de solución de Dalargina al 1% durante 40 minutos una vez al día). La dosis recibida (la dosis que alcanzó los alveolos) fue de 0,5 mg/kg. La HED corresponde a 3 mg/kg;

Grupo 7: Los ratones recibieron solución de Dalargina al 3% por inhalación durante 45 minutos una vez al día. La dosis recibida (la dosis que alcanzó las alveolos) fue 1,74 mg/kg, lo que corresponde a una HED de 10 mg/kg.

Grupo 8: Los ratones recibieron un régimen profiláctico de Ingavirina® a una dosis de 15 mg/kg por vía intragástrica una vez al día los días 3, 2, 1 y 1 hora antes de la exposición.

Grupo 9: Los ratones recibieron inhalaciones de solución de Dalargina al 3% durante 45 minutos dos veces al día los días 3, 2 y 1 y 1 hora antes de la exposición; no se administró ningún tratamiento adicional después de la exposición.

Grupo 10: El producto se administró por vía nasal y se aplicó pulverizando sobre la pared posterior de la faringe (PS) a una dosis de 0,5 mg/kg (como 5 µL de solución al 0,2% y 10 µL de solución al 0,1%) una vez al día los días 3, 2 y 1 y 1 hora antes de la exposición; no se administró ningún tratamiento después de la exposición.

Como criterios de valoración de la eficacia primaria se usaron los siguientes parámetros:

Mortalidad (%): Relación del número de animales muertos con respecto al número total de animales infectados en el grupo: $M\% = M/N_t$, donde M es el número de animales muertos, y N_t es el número de animales infectados.

Índice protector (%): Relación de la diferencia en el porcentaje de mortalidad en los grupos de control y experimental al porcentaje de mortalidad en el grupo de control: $PI = ((Mc - Me) / Mc) * 100\%$, donde Mc es la mortalidad del grupo de control, y Me es la mortalidad del grupo experimental.

5 La supervivencia se evaluó usando el método de Mantel-Cox ajustado para comparaciones múltiples, se representaron gráficamente las curvas de Kaplan-Meier usando IBM SPSS v. 22.0.

Determinación de la carga vírica en el tejido pulmonar.

Los animales se expusieron bajo anestesia con éter. Los ratones se expusieron a 2,0 lg de TCID₅₀ por animal administrado como 0,025 mL de material que contenía virus por fosa nasal.

10 Se sacrificaron tres animales por grupo para las determinaciones de la carga vírica. Para determinar la carga vírica, se recogieron los pulmones de los ratones el día 5 después de la exposición y se homogeneizaron en un exceso de diez veces de tampón fosfato estéril, y se usaron homogeneizados reunidos de cada grupo para preparar una dilución en serie al décuplo en el mismo tampón. Estas diluciones en serie se usaron para infectar células MDCK en microplacas de 96 pocillos, que se cultivaron durante 48 horas a 36 °C en una atmósfera con CO₂ al 5%. La carga vírica se calculó usando el método de Spearman-Kärber [18] y se expresó como lg TCID₅₀/mL (lg del número de dosis infecciosas medias de cultivo tisular por mL).

Resultados

Los signos clínicos de enfermedad en ratones infectados fueron típicos de infecciones por gripe. No hubo mortalidad no específica en el grupo intacto. Los datos sobre la dinámica de mortalidad se resumen en la Tabla 3.

20 Se sacrificaron tres animales de cada grupo el día 5 del experimento con el fin de determinar la carga vírica en el tejido pulmonar. Los resultados del ensayo de la carga vírica se representan en la Fig. 1 en lg TCID₅₀/mL.

25 Los resultados indican que la Dalargina administrada por inhalación es superior a otros fármacos antivíricos (Ingavirina® y Arbidol®) para la prevención de neumonía por gripe. Además, se demostró que no se podía lograr una mayor eficacia aumentando las dosis inhaladas de Dalargina. La eficacia máxima se demostró para el grupo 6, que recibió solución de Dalargina al 1% por inhalación durante 40 minutos una vez al día. La dosis absorbida individual (la dosis que alcanzó los alveolos) fue 0,5 mg/kg, lo que corresponde a una HED de 3 mg/kg. Estos datos se correlacionaron con la carga vírica determinada en los pulmones (Fig. 1).

30 También se demostró que la administración preventiva de Dalargina exhibe un efecto protector contra la infección en 50-70% de los animales dependiendo de la vía de administración. El fenómeno de la protección antivírica se debió al pronunciado efecto profiláctico de la Dalargina que se manifiesta como efecto antivírico directo y activación de la inmunidad local mediada por células en el "portal de entrada": La nariz, la nasofaringe, la orofaringe y la cavidad oral y, en el caso de inhalación, adicionalmente en los bronquios y la tráquea.

Ejemplo 8. Caso clínico

Paciente K, edad 35 años. El paciente se presentó en el hospital sin ayuda, con síntomas de tos seca, fatiga grave, sudoración, mareo y fiebre hasta 39 °C.

35 Diagnóstico en el ingreso: IRV.

Historia médica. Comorbilidades: diabetes mellitus tipo 2; obesidad de clase III. Inicio agudo, auto-tratamiento con abundante líquido, miel, reposo en cama. La afección no mejoró, después de lo cual el paciente, sin ayuda, buscó atención médica en el hospital.

40 Síntomas: Fiebre durante los 4 días anteriores, dolor muscular y articular, dolor en el movimiento ocular, fotofobia, tos seca con esputo mucoso escaso, debilidad creciente, dificultad para respirar, dolor retroesternal y dolores. No recibió vacunaciones contra la gripe durante los 5 años anteriores.

45 En la admisión: La afección es moderadamente grave. Temperatura corporal: 38,6 °C. Piel pálida. En la auscultación suena respiración bronquial dura. RR en reposo: 20/min.; BP: 130/90 mm de Hg; HR: 90/min. SaO₂ = 91%. El abdomen es blando, sin dolor a la palpación, sin edema. Se recogieron hisopos para PCR y virología de la nasofaringe y la orofaringe. Se recogió esputo para bacteriología.

Hallazgos radiológicos: Prominencia simétrica uniforme de la vascularización pulmonar, los contornos son afilados, las raíces están estructuradas. Sombras de foco fino en la periferia de los lóbulos pulmonares inferiores. El patrón radiológico es consistente con la etapa I del síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA).

50 ECG: Ritmo sinusoidal. Posición horizontal del CA. HR: 94 pulsaciones por minuto. Se observa una débil amplitud de la onda P en las derivaciones I-II y las derivaciones torácicas V2-V6.

Resultados de los ensayos de laboratorio e instrumentales: Hemograma completo: hemoglobina: 116 g/L, RBC: $4,2 \cdot 10^{12}/L$, WBC: $4,1 \cdot 10^9/L$, eosinófilos: 0%, basófilos: 0%, células de banda 5,0%; células segmentadas: 52, 0%, linfocitos: 42,0%, monocitos: 1,0%, ESR: 13 mm/h; análisis de orina clínico: peso específico: 1012, proteína: 25, glucosa: positiva, epitelio: considerable, WBC: 2-10 por FOV, RBC: 1-2 por FOV.

5 Ensayo de expresión de PCR: Virus de la gripe A detectado.

Diagnóstico (ICD-10: J10.0): Gripe moderada complicada por neumonía, virus de la gripe identificado. Neumonía por gripe.

10 Terapia administrada. Terapia primaria: Oseltamivir: 75 mg dos veces al día durante 5 días; adicionalmente: inhalación de solución de Dalargina al 0,02% dos veces al día usando un nebulizador, dosis total de 1 mg/día. Terapia sintomática: Terapia antipirética, detoxificante y mucolítica. Terapia adyuvante con fármacos hipoglucémicos. Monitorización de la glucosa en sangre. El inicio de los procedimientos de inhalación de Dalargina fue seguido inmediatamente por cambios positivos en el estado del paciente. Mejoras notables incluyeron una reducción de los signos clínicos de intoxicación, comienzo de la conversión de tos seca en tos productiva, retorno del apetito el día 2. Los síntomas se han resuelto completamente el día 7 después del inicio de la terapia.

15 Virología detectó la cepa A/Aichi/2/68 (H3N2).

La bacteriología del esputo no detectó contaminación bacteriana como factor causante de neumonía. Por consiguiente, no hubo necesidad de administrar tratamiento antibacteriano adicional.

20 Condición en la descarga: Satisfactoria. Parámetros clínicos y de laboratorio: Dentro del intervalo normal. El ECG muestra la normalización de la forma y el tamaño de la onda P. Radiología: Los campos pulmonares no presentan sombras focales o infiltrativas; la vascularización pulmonar no aumenta, las raíces están estructuradas, no dilatadas; los órganos pectorales no muestran signos de cambios fibróticos residuales. Los resultados de la espirometría no muestran desviaciones de FEV o FVC.

Ejemplo 9. Caso clínico. Uso de Dalargina como agente para la prevención de la infección por gripe

25 Para evitar contraer la gripe, parientes del paciente V. (4 personas) se autoadministraron Dalargina desde el día 1 de la aparición de síntomas en el paciente primario según un régimen similar, pero una vez al día (solución al 0,02% para inhalación una vez al día administrada con un nebulizador a una dosis de 1 mg/día, el volumen total de la solución de inhalación fue de 5 mL).

Los miembros de la familia del paciente no habían recibido vacunación durante los 5 años anteriores.

30 No se administró un régimen profiláctico de Oseltamivir, a pesar de haber sido recomendado por el médico responsable.

Todos los miembros de la familia (una mujer de 35 años de edad, un niño de 13 años de edad, una mujer de 62 años de edad y un hombre de 67 años de edad) tuvieron un alto riesgo de transmisión por contacto de infección por gripe dentro del hogar.

35 Se administró Dalargina por inhalación como solución al 0,02% una vez al día a una dosis de 1 mg/día (con un nebulizador) como tratamiento profiláctico.

Ninguno de los parientes del paciente V que estaban en contacto con él mostró signos catarrales, hipertermia u otros signos o síntomas de gripe a lo largo del posible periodo de incubación: 7 días desde el inicio de la enfermedad y síntomas en el paciente V.

40 Conclusión: La inhalación de solución de Dalargina es un método eficaz de profilaxis de la gripe en personas con alto riesgo de transmisión de enfermedades. Este producto puede usarse como monoterapia o como parte de un régimen profiláctico combinado con otros fármacos antiviricos. Este hallazgo puede justificar un ensayo clínico de la eficacia de la inhalación de Dalargina para la prevención de la gripe y otras IRV.

Ejemplo 10. Caso clínico: Uso de Dalargina en gripe moderada sin complicaciones en pacientes ambulatorios

45 Paciente V, edad 37 años. El paciente llamó a una ambulancia debido a la aparición aguda de la enfermedad. La afección del paciente es moderada. Temperatura corporal: 39,1 °C. Toxicosis infecciosa grave; cefalea, debilidad, hiperhidrosis, dolor de articulaciones y músculos. Catarro: Tos molesta seca con dolor retroesternal, dolor de garganta y nariz escamosa. La auscultación revela sonidos de respiración bronquial dura que no se debilitan en los lóbulos inferiores. RR en reposo: 22/min.; BP: 110/75 mm de Hg; HR: 92/min. SaO₂ = 92%. Sin síndrome meníngeo. El abdomen es blando, sin dolor a la palpación, sin edema. No recibió vacunación contra la gripe durante los 5 años anteriores.

50 Diagnóstico realizada por el equipo de la ambulancia: IRV (¿gripe?). Terapia antipirética administrada. El paciente se dejó bajo la supervisión del médico local.

Se recogieron hisopos para virología de la nasofaringe y orofaringe. Terapia antivírica prescrita: Oseltamivir 75 mg dos veces al día durante 5 días. Recomendaciones adicionales incluyeron terapia antipirética y mucolítica sintomática, reposo en cama y beber abundante fluido.

- 5 El paciente se autoadministró una solución de Dalargina al 0,1% dos veces al día mediante inhalación usando un nebulizador, la dosis total fue de 4 mg/día. Los signos clínicos de intoxicación mejoraron rápidamente después del inicio de las inhalaciones. El día 2 de la terapia, la tos seca se convirtió en tos productiva y el apetito mejoró. La fiebre terminó el día 3 de la terapia. Los síntomas se han resuelto completamente el día 5 después del inicio de la enfermedad (y, correspondientemente, el inicio de la terapia con Dalargina).

Los resultados de virología detectaron la cepa A/California/07/2009 (H1N1, cepa pandémica).

- 10 Diagnóstico (ICD-10: J10.0): Gripe moderada, virus de la gripe identificado.

Conclusión: La duración media de la gripe moderada es de 6-8 días, la duración habitual de la fiebre (en caso de gripe no complicada) es de aproximadamente 5 días [25]. Sin embargo, en este caso clínico el tratamiento adicional con Dalargina por inhalación estuvo asociado con una reducción significativa en la duración de los síntomas de intoxicación (2 días), fiebre (3 días) y la enfermedad como un todo (5 días).

- 15 La presentación clínica existente de complicaciones graves de las IRV, que incluyen formas graves de infecciones por gripe y coronavirus, indica que la etapa grave de las enfermedades representa más del 90% de los costes de tratamiento y la gran mayoría de los resultados fatales del paciente. El tratamiento en la etapa de complicaciones de la neumonía es un proceso bastante costoso e ineficiente.

- 20 Por lo tanto, la forma óptima de reducir la mortalidad y los costes a nivel nacional implicaría administrar Dalargina en forma de pulverización para irrigar las vías nasales, la nasofaringe, la orofaringe y la cavidad oral o por inhalación a personas de poblaciones de riesgo: Las que viven con miembros de la familia infectados, las que están en contacto con pacientes o grandes grupos de personas, tales como los oficiales de aplicación de la ley, militares, etc. Siempre que se produzca una infección, administrar soluciones de Dalargina por inhalación según los regímenes descritos permitiría muy probablemente evitar complicaciones y mantener la enfermedad leve, incluso evitar la hospitalización.

25 Referencias de referencias

- [1] V.I. Pokrovsky et al. Influenza and influenza-like infections (including especially dangerous forms of influenza infections) // Basic and applied aspects of study: Bulletin of the task group. St Petersburg, Roza mira. - 2008. - Vol. 109.
- [2] N.B. Lazareva, M.V. Zhuravlyova, L.R. Panteleyeva. ARVI: Rational Pharmacotherapy from the Standpoint of Clinical Pharmacology // Meditsinsky Sovet. - 2016. Nº. 4.
- 30 [3] Sullivan K. M., Monto A. S., Longini Jr I. M. Estimates of the US health impact of influenza //American journal of public health- 1993 - Vol. 83. - Nº. 12 - p. 1712-1716.
- [4] Según Informes de la Institución Federal de Salud Estatal "Centro Federal de Higiene y Epidemiología de Rospotrebnadzor de la Federación Rusa". URL: Disponible en: <http://www.fcgsen.ru>.
- 35 [5] Clinical Practice Guidelines on Severe Forms of Influenza, 2016, Ministerio de Salud de Rusia, ICD-10: J10-J11.
- [6] Turner R.B. Epidemiology, pathogenesis, and treatment of common cold //Annals of allergy, asthma & immunology. - 1997. - Vol. 78. Nº. 6. - p. 531-540.
- [7] Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment of Severe Forms of Combined Viral-Bacterial Pneumonias. Instituto de Investigación Clínica Oblast de Moscú, libro de texto, Moscú, 2016.
- 40 [8] O.A. Loskutov, A.N. Druzhina, V.G. Kolesnikov. Antiviral and antibacterial therapy in the treatment of community-acquired pneumonias/ // Meditsina Neotlozhnykh Sostoyaniy - 2016. Nº. 3 (74).
- [9] URL: <https://lor-bolezni.ru/pnevmoniya/ingalyatsii-pri-pnevmonii-nebajzerom.html>, accedido el 02.07.2019.
- [10] T.F. Borovskaya, E.Kh. Kurpas, S.N. Gorislavets. Application of Dalargin for the treatment of patients with community-acquired pneumonia // Byulleten Fiziologii i Patologii Dykhaniya - 2004. Nº. 17.
- 45 [11] V.K. Khugayeva. Effect of Dalargin on microhemocirculation and lymphatic microcirculation// Byul. eksper. biol. - 1998 - Nº. 3 - p. 300-302.
- [12] G.V. Lisachenko. Effect of Dalargin on haemodynamics in acute myocardial infarction complicated by clinical death /G.V. Lisachenko, G.K. Zoloyev, V.D. Slepishkin //Anest. i reanimat. - 1992 - Nº. 4 - p. 57-59.
- 50 [13] V.P. Dubynina. Nebulizer therapy of acute and chronic respiratory tract diseases // Moscú, Inter-Eton, 2008 - 48 páginas - 2005.

- [14] Gur D. et al. Inhalational gentamicin treatment is effective against pneumonic plague in a mouse model //Frontiers in microbiology - 2018 - Vol. 9 - p. 741.
- [15] Méndez L. B., Gookin G., Phalen R. F. Inhaled aerosol particle dosimetry in mice: a review //Inhalation toxicology. - 2010 - Vol. 22 - Nº. 12 - p. 1032-1037.
- 5 [16] Kolanjiyil A. V. et al. Mice-to-men comparison of inhaled drug-aerosol deposition and clearance //Respiratory physiology & neurobiology - 2019 - Vol. 260 - pag. 82-94.
- [17] Informe "Evaluation of the antiviral activity of Orvidal API with nasal and intramuscular administration at different doses and concentrations in an influenza pneumonia model in mice". IFOR. Tomsk, 2020.
- [18] Virology. A practical approach/Traducido del inglés, B. W. J. Mahy. 1988; 344 páginas.
- 10 [19] V. A. Aleksandrovskaya et al. Dalargin: Pharmacological and clinical aspects. // Pediatriya, 1993 - No. 3 - págs. 101-104.
- [20] E.I. Kalenikova, O.F. Dmitriyeva, N.V. Korobov, S.V. Zhukovsky, V.A. Tishchenko, V.V. Vinogradov. Pharmacokinetics of Dalargin // Voprosy Med. Khimii, 1988, No. 1, págs. 75-83.
- 15 [21] Kotzer C.J., Hay D.W., Dondio G., Giardina G., Petrillo P., Underwood D.C. The antitussive activity of delta-opioid receptor stimulation in guinea pigs. J Pharmacol Exp Ther 2000; 292(2): 803-809.
- [22] P. B. M. C. N. P. M. V. P. P. M. N. o. f. t. p. o. d. i. t. i. p. A. J. o. H.-S. P. V. 7. I. 1. 1. 1. J. 2. P. Tilola M. Afolabi.
- [23] Patente RU 2672888 de 18.04.2018. Agente Inmunotrópico Antivírico para el Tratamiento de Infecciones Víricas Respiratorias Agudas.
- 20 [24] Ansaldi, F., Banfi, F., Morelli, P., Valle, L., Durando, P., Sticchi, L., Contos, S., Gasparini, R., & Crovari, P. (2004). SARS-CoV, influenza A and syncytial respiratory virus resistance against common disinfectants and ultraviolet irradiation. Journal of Preventive Medicine and Hygiene, 45(1-2), 5-8.
- [25] Clinical Practice Recommendations "Influenza in Adults". Asociación sin fines de lucro "National Scientific Society of Infectologists". Aprobado el 30 de octubre de 2014.

Tabla 1

Grupo de tratamiento/sustancia de ensayo	Concentración, µg/mL	Parámetros de actividad inhibidora de virus							
		PR8 (virus de la gripe)				Ad5 (adenovirus)			
		Título del virus (lg TCID ₅₀ /0,1 mL)	CCD ₅₀ , µg/mL	IC ₅₀ , µg/mL	SI	Título del virus (lg TCID ₅₀ /0,1 mL)	CCD ₅₀ , µg/mL	IC ₅₀ , µg/mL	SI
Dalargina	30	4,0	30	0,8	>37,5	3,5	30	2,5	12
Dalargina	10	4,5				4,0			
Dalargina	3,3	5,0				4,0			
Dalargina	1,1	5,0				4,5			
Dalargina	0,4	5,5				4,5			
Control de virus	0	5,5				4,5			
Comparador Rimantadina	5 µg/mL	-	64	11	5				
Comparador Aciclovir	30 µg/mL					-	> 30	> 30	1

Tabla 2

Grupo de animales	Animales por grupo	Mortalidad por día							Residuo	Mortalidad, %	Índice de protección, %
		5	6	7	8	9	10	11			
1	30	3	4	7	7	5	-	-	4	86,67	-

ES 3 002 532 T3

2	30	-	-	-	-	2	1	-	27*	10,00	88,46
3	30	2	2	5	4	3	1	-	13	56,67	34,61
4	30	-	-	-	-	2	-	1	27*	10,00	88,46
5	30	-	-	-	1	-	1	-	28*	6,67	92,30
6	30	-	-	1	-	-	1	-	28*	6,67	92,30
7	30	2	3	6	6	4	1	1	7	76,67	11,54
8	30	1	3	2	3	3	-	-	18	40,00	53,85
9	30	-	4	4	4	2	1	-	15	50,00	42,31

Tabla 3

Grupo de animales	Animales por grupo	Mortalidad por día							Residuo	Mortalidad, %	Índice de protección, %
		5	6	7	8	9	10	11			
1	30	3	5	6	7	5	2	1	1	96,67%	-
2	30	-	4	6	3	2	1	-	14	53,33%	44,83%
3	30	2	2	7	5	3	2	-	9	70,00%	27,59%
4	30	2	4	9	-	1	-	1	13	56,67%	41,38%
5	30	-	1	2	3	5	1	-	18	40,00%	58,62%
6	30	-	-	1	1	-	-	-	28	6,67%**	93,10%
7	30	-	-	1	1	1	-	-	27	10,00%* *	89,66%
8	30	3	4	4	7	4	2	-	6	80,00%	17,24%
9	30	-	2	3	2	2	-	-	21	30,00%	68,97%
10	30	2	4	2	3	2	1	-	16	46,67%	51,72%

REIVINDICACIONES

1. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en forma de pulverización y/o en una forma inhalada para la prevención de infecciones respiratorias víricas o para la prevención de sus complicaciones mediante administración en forma de pulverización para irrigar las fosas nasales, la nasofaringe, la orofaringe y la cavidad oral y/o mediante inhalación.
2. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina según la reivindicación 1, como componente de una composición que se administra como una pulverización y/o como una solución de inhalación.
3. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en la composición según la reivindicación 2, en donde la composición se usa para la prevención de infecciones respiratorias víricas mediante inhalación o como una pulverización con un tamaño de partícula de 5-50 μm .
4. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en la composición según la reivindicación 2, en donde la composición se usa para irrigar toda la superficie de la nasofaringe, la orofaringe y la cavidad oral y se aplica sublingualmente, bajo la lengua, para crear un efecto de barrera protectora sobre las membranas mucosas.
5. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en la composición según la reivindicación 2, en donde la composición se usa para la prevención del desarrollo de complicaciones de infecciones respiratorias víricas mediante inhalación con un tamaño de partícula de 0,5-10 μm , preferiblemente 0,5-3 μm .
6. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en la composición según la reivindicación 2, en donde la composición, que se administra en forma de pulverización y/o como una solución para inhalación, contiene un inhibidor del crecimiento microbiano, tal como cloruro de benzalconio, normalmente en el intervalo de concentraciones de 0,005-0,1% en peso, preferiblemente 0,01%.
7. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en la composición según las reivindicaciones 2 ó 6, en donde la composición tiene un pH ácido en el intervalo de 3 a 7, preferiblemente pH = 4,0-5,5.
8. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en la composición según la reivindicación 7, en donde la composición que contiene diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina, que se administra en forma de pulverización y/o como una solución de inhalación, contiene tampón acetato.
9. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en la composición según las reivindicaciones 2 a 8, que contiene un regulador de viscosidad seleccionado del grupo de celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa de sodio, macrogol, propilenglicol, glicerol, polivinilpirrolidona y N-metilpirrolidona y/o polímeros con propiedades bioadhesivas, tensioactivos o detergentes no iónicos con propiedades mucoadhesivas, preferiblemente poloxámeros.
10. Diacetato de tirosil-D-alanil-glicil-fenilalanil-leucil-arginina para su uso en la composición según las reivindicaciones 2 a 9, en donde la administración en forma de pulverización comprende irrigación simultánea de la cavidad oral, la nasofaringe, la orofaringe y el área sublingual.

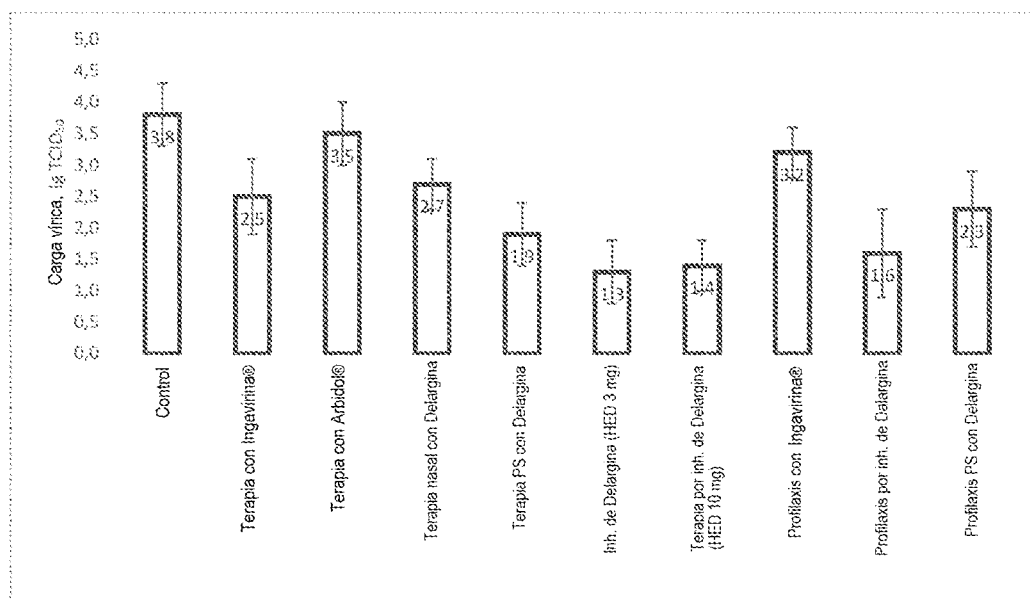


Fig. 1