



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 505**

51 Int. Cl.:
A61K 31/60 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04700037 .7**
96 Fecha de presentación : **02.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1599194**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.11.2005**

54 Título: **Uso de ácido acetilsalicílico para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades virales.**

30 Prioridad: **03.01.2003 DE 103 00 222**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.03.2011

73 Titular/es: **ACTIVAERO GmbH**
Wohraer Strasse 37
35285 Gemünden, DE

72 Inventor/es: **Planz, Oliver;**
Pleschka, Stephan;
Sedlacek, Hans-Harald y
Ludwig, Stephan

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 355 505 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).

DESCRIPCION

USO DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO PARA LA PROFILAXIS Y/O EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES VIRALES

Campo de la invención.

5 La invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene ácido acetilsalicílico (AAS) para el tratamiento de enfermedades infecciosas virales.

Estado de la técnica y antecedentes de la invención

10 Las infecciones por virus de ARN o ADN representan una amenaza significativa para la salud de los seres humanos y los animales. A los virus de ARN pertenecen los virus de ARN de cadena negativa, tales como por ejemplo el virus de la gripe o el virus de la enfermedad de Borna. Las infecciones por virus de la gripe pertenecen todavía a las grandes epidemias de la

15 humanidad y suponen año tras año un gran número de víctimas mortales. Son a nivel macroeconómico, por ejemplo por la incapacidad laboral transitoria por enfermedad, un factor de coste inmenso. También son de importancia económica importante las infecciones por el virus de la enfermedad de Borna (VEB),

20 que afecta sobre todo a caballos y ovejas, aunque ya se aisló también en el ser humano y en este caso se asoció con enfermedades neurológicas.

 El problema de la lucha contra, en particular, virus de ARN es la capacidad de transformación de los virus provocada por una

25 elevada tasa de error de las polimerasas virales, que dificulta mucho tanto la producción de vacunas adecuadas como el desarrollo de sustancias antivirales.

 Además se ha demostrado que, si bien la utilización de sustancias antivirales, que se dirigen directamente contra las

30 funciones del virus, muestra al comienzo del tratamiento una buena acción antiviral, sin embargo debido a la mutación conduce muy rápidamente a la selección de variantes resistentes. Un ejemplo para esto es el agente antigripal amantadina y sus derivados, que se dirige o dirigen contra una proteína

35 transmembrana del virus. En el transcurso de poco tiempo tras su utilización se forman variantes resistentes del virus.

Un ejemplo adicional son los nuevos agentes terapéuticos para infecciones gripales, que inhiben la proteína de superficie del virus de la gripe neuraminidasa. A éstos pertenece por ejemplo Relanza. Ya se han encontrado variantes resistentes a Relanza en pacientes (Gubareva *et al.*, J Infect Dis 178, 1257-1262, 1998). Por tanto no pudieron satisfacerse las esperanzas depositadas en este agente terapéutico.

Debido a sus genomas, en la mayoría de los casos muy pequeños, y la capacidad de codificación limitada asociada con ello para funciones necesarias para la replicación, todos los virus dependen en gran medida de las funciones de sus células huésped. Influyendo sobre tales funciones celulares, que son necesarias para la replicación viral, es posible influir negativamente en la replicación del virus en la célula infectada. A este respecto el virus no tiene la posibilidad de sustituir, mediante adaptación, en particular mediante mutaciones, la función celular que falta, para evitar así la presión de selección. Esto ya pudo demostrarse en el ejemplo del virus de la gripe A con sustancias inhibitoras relativamente inespecíficas contra metiltransferasas y cinasas celulares (Scholtissek y Müller, Arch Virol 119, 111-118, 1991).

Se sabe que las células disponen de un gran número de rutas de transducción de señales, con ayuda de las cuales se transmiten al núcleo celular las señales que actúan sobre la célula. De este modo la célula puede reaccionar a los estímulos externos y reaccionar con la proliferación celular, activación celular, diferenciación o muerte celular controlada.

Es común a estas rutas de transducción de señales que contengan al menos una cinasa, que activan mediante fosforilación al menos una proteína transductora de señales a continuación.

Al observar los procesos celulares que se inducen tras las infecciones por virus, se encuentra que un gran número de virus de ADN y ARN en la célula huésped infectada activan preferiblemente una ruta de transducción de señales definida, la denominada ruta de transducción de señales Raf/MEK/ERK-cinasa. Esta ruta de transducción de señales es una de las rutas de

transducción de señales más importantes en una célula y desempeña un papel significativo en los procesos de proliferación y diferenciación (Cohen, Trends in Cell Biol 7, 353-361, 1997; Robinson y Cobb, Curr. Opin. Cell Biol 9, 180-186, 1997; Treisman, Curr. Opin Cell Biol 8, 205-215, 1996).

El estudio del papel de esta ruta de transducción de señales en los procesos de decisión celulares ha llevado a la identificación de varios inhibidores farmacológicos, que inhiben la ruta de transducción de señales entre otros a nivel de la MEK, es decir relativamente al comienzo de la ruta de transducción de señales (Alessi *et al.*, J Biol Chem 270, 27489-27494, 1995; Cohen, Trends in Cell Biol 7, 353-361, 1997; Dudley *et al.*, PNAS USA 92, 7686-7689, 1995; Favata *et al.*, J Biol Chem 273, 18623-18632, 1998).

Datos recientes muestran que la inhibición de la ruta de transducción de señales Ras-Raf-MEK-ERK o una ruta de transducción de señales adicional, de la ruta de transmisión de señales MEKK/SEK/JNK, mediante sustancias activas, que inhiben de manera relativamente selectiva una de las cinasas implicadas en esta ruta de transducción de señales, por ejemplo la MEK o la SEK, pueden inhibir drásticamente la multiplicación intracelular de virus de cadena negativa con replicación intranuclear, por ejemplo de virus de la gripe A y virus de la enfermedad de Borna (VEB) (Pleschka *et al.*, Nature Cell Biol 3, 301-305, 2001; Planz *et al.*, J Virol 10, 4871-4877, 2001; PCT/DE 01/01292; DE 101 38 912).

Hasta la fecha se sabía que los virus de la gripe aprovechan preferiblemente la ruta de transducción de señales Raf-MEK-ERK o la ruta de transducción de señales MEKK/SEK para su multiplicación y como consecuencia una inhibición de estas rutas de transducción de señales lleva a una inhibición completa de la multiplicación viral. Dado que, sin embargo, en una célula las rutas de transducción de señales apenas presentan una función en sí finalizada, sino que en caso de la activación de una ruta de transducción de señales a través de reticulaciones se activan adicionalmente rutas de transducción de señales adicionales en diferente medida, no debe descartarse por

principio que tanto la célula como los virus puedan evitar una ruta de transducción de señales inhibida y que el efecto terapéutico de una sustancia activa, que inhibe una multiplicación de los virus mediante la inhibición de una ruta de transducción de señales determinada, pueda verse limitado por esto.

Por tanto existe una gran necesidad de encontrar y usar sustancias activas antivirales, que actúen de manera adicional o complementaria con aquéllas que inhiben las cinasas de las rutas de transducción de señales celulares, por ejemplo de la ruta de transducción de señales Raf-MEK-ERK o de la ruta de transducción de señales MEKK/SEK/JNK. Tales principios activos ya se han descrito en los documentos de la bibliografía PCT/DE 01/01292 y DE 101 38 912.

Una de las rutas de transducción de señales importantes en la célula es la ruta de transducción de señales del factor nuclear de kappaB (NF-kB). El componente central de esta ruta de transducción es el complejo de proteínas de transcripción NF-kB heterodimérico, compuesto por un lado por p50 [que resulta de la proteólisis de NF-kB1 (p105)] o por p52 [que resulta de la proteólisis de NF-kappaB2 (p100)] y por otro lado por p65 (RELA), c-REL o RELB. El complejo NF-kB más frecuente está compuesto por p50 y p65.

La actividad de transcripción de este complejo NF-kB se inhibe mediante la unión de las proteínas inhibidoras de NFkB (IkB) en la secuencia de unión nuclear de p65. Con esto el complejo permanece en el citoplasma. La activación de la célula por ejemplo mediante factores de crecimiento, quimiocinas, TNF-alfa, Il-1, ligando CD40, LPS o en el marco de una infección por virus conduce a la activación de cinasas tales como la "cinasa inductora de NF-kB" (NIK), la cinasa TAK, la cinasa AKT y posiblemente también de la cinasa MEKK1. Estas cinasas llevan a la activación del complejo "inhibidor de kB (IkB)-cinasa" (IKK), compuesto por IKK-alfa, IKK-beta y NEMO. La IKK activada fosforila el IkB y lleva así a su degradación y permite por consiguiente la liberación, translocación nuclear y activación de la actividad de transcripción del heterodímero p50/p65. Un

complejo NF-kB adicional está compuesto por p100 y RELB. La activación de la célula mediante linfotoxinas lleva, supuestamente mediada de manera preferible por NIK, a la activación de IKK-alfa. La IKK activada induce la fosforilación y por consiguiente la proteólisis de p100 para dar p52, que a su vez puede translocarse en el complejo con el RELB al interior del núcleo celular y pasar allí a ser activo como factor de transcripción.

Se sabe que i) los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como por ejemplo el sulindaco (Yamamoto *et al.*, J Biol Chem 274, 27307-27314, 1999; Berman *et al.*, Clin Cancer Res 8, 354-360, 2002) o derivados de sulindaco tales como por ejemplo sulindaco-sulfóxido, sulindaco-sulfona, sulindaco-sulfuro o análogos de sulindaco-bencilamida (Moon y Lerner, Cancer Research 62, 5711-5719, 2002) o ácido acetilsalicílico o ácido salicílico (Yin *et al.*, Nature 396, 77-80, 1998) o curcumina (Oncogene 18, 6013-6020, 1999) mediante la inhibición de IKK-beta, ii) péptidos que se unen a NEMO (May *et al.*, Science 289, 1550-1554, 2000), inhibidores proteosómicos tales como por ejemplo PS-341 (Tan y Waldmann, Cancer Res 62, 1083-1086, 2002; Adams Trends Mol Med 8, 49-54, 2002) o iii) secuencias de nucleótidos antisentido específicas para p65 o p50 (Higgins *et al.*, PNAS-USA 90, 9901-9905, 1993) pueden inhibir la activación de la ruta de transducción de señales NF-kB. Sin embargo, hasta la fecha estas sustancias inhibidoras se han sometido a ensayo sin excepción para determinar su uso como principios activos para influir en inflamaciones y el crecimiento de tumores, dado que en ambas indicaciones las células implicadas presentan una activación aumentada de la ruta de transducción de señales NF-kB (Karin *et al.*, Nature Reviews Cancer 2, 301-310, 2002).

Hasta la fecha existía la idea de que una infección por virus, en particular también una infección por virus de la gripe, activa a través de la activación de la IKK la ruta de señales NF-kB, que a su vez está implicada de manera decisiva en la expresión aumentada por esta infección de proteínas activas antivirales tales como por ejemplo el interferón (Chu *et al.*, Immunity 11, 721-731, 1999). Con esta idea concuerda el hallazgo

de que la actividad inducida por el virus de la gripe del promotor del interferón- β está enormemente reducida en las células que expresan una mutación negativa transdominante de IKK2 o de Ik-B-alfa (Wang *et al.*, Virol 74, 11566-11573, 2000).

5 Por otro lado existe el indicio que contradice estas ideas y hallazgos, de que el ácido acetilsalicílico, conocido como inhibidor de la IKK, en cultivo celular también puede inhibir infecciones por virus de la gripe, sin embargo sólo a partir de concentraciones de 5-10 mM (correspondientes a 0,9-1,8 mg/ml).
 10 Prácticamente no pueden alcanzarse concentraciones de este tipo en sangre tras la administración oral de ácido acetilsalicílico sin efectos secundarios considerables (Huang y Dietsch, New Engl J Med 319, 797, 1988). El ácido acetilsalicílico se considera el analgésico más tóxico de todos los disponibles libremente en la
 15 actualidad con la amplitud terapéutica más reducida (Jones, Am J Ther 9, 245-257, 2002). No obstante Huang y Dietsch especulan con conseguir mayores concentraciones y por consiguiente, eficaces desde el punto de vista antiviral localmente en las vías respiratorias, mediante una administración de aerosol. Sin
 20 embargo estas recomendaciones no se han puesto en práctica hasta la fecha, dado que ya sólo los efectos secundarios clínicos conocidos hasta el momento tras la administración oral de una dosis no considerada por lo demás como tóxica de 100 mg de ácido acetilsalicílico llevaron a advertir sobre la toma de aspirina
 25 en caso de gripe vírica especialmente en niños (instrucciones de uso n.º de autorización 14.252 de Bayer AG con respecto al preparado de ácido acetilsalicílico (AAS) Aspirina®).

Problema técnico de la invención

30 La invención se basa en el problema técnico de proporcionar una formulación con AAS para el tratamiento de infecciones virales.

Aspectos fundamentales de la invención y formas de realización.

35 La invención se basa en el conocimiento de que i) los principios activos, que inhiben la ruta de transducción de señales NF-kB celular, pueden inhibir la multiplicación de virus en un organismo, ii) en caso de administración local,

concentraciones más reducidas del principio activo utilizado según la invención son eficaces desde el punto de vista antiviral tal como puede deducirse de los datos *in vitro*, iii) el principio activo utilizado según la invención ácido acetilsalicílico administrado por vía aerógena en concentraciones de desde 0,1 hasta 4 mM provoca una inhibición clara de la multiplicación del virus de la gripe en el pulmón y en todo el organismo y un efecto de curación sistémico sin afectar al estado de salud general, aunque las concentraciones de este tipo del ácido acetilsalicílico *in vitro* no han mostrado ninguna eficacia antiviral. Dosis más altas de ácido acetilsalicílico, por ejemplo ácido acetilsalicílico en concentraciones de 10 mM, no eran comparativamente más fuertes, dosis aún más altas (hasta 50 mM) tenían una eficacia antiviral claramente menor que las concentraciones reducidas según la invención. Adicionalmente las concentraciones a partir de 20 mM tras la administración aerógena resultaron ser tóxicas.

El objeto de la presente invención es por tanto el uso según la reivindicación 1. Son componentes de la ruta de transducción de señales NF- κ B por ejemplo: el factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF), la cinasa que induce NF- κ B (NIK), la proteína cinasa activada por mitógeno cinasa cinasa 1 (MEKKK1), la proteína cinasa activada por mitógeno cinasa cinasa 3 (MEKKK3), la cinasa de timoma de ratón AKR (AKT), la cinasa activada por TGF β (TAK1), el inhibidor de la cinasa NF- κ B alfa (IKK-alfa), el inhibidor de la cinasa NF- κ B beta (IKK-beta), NEMO, el inhibidor de κ B (I κ B), RELA (p65), C-REL, RELB, NF- κ B1 (p105), NF- κ B2 (p100), P50, P52.

Preferiblemente el uso según la invención tiene lugar para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades virales, provocadas por virus de ARN o ADN, preferiblemente virus de ARN de cadena negativa, por ejemplo virus de la gripe o virus de Borna.

También se prefiere el uso de ácido acetilsalicílico para la profilaxis o el tratamiento de una infección por virus de la gripe, en el que el ácido acetilsalicílico se administra por vía

bronquial (por vía aerógena) en concentraciones de desde preferiblemente 0,1 hasta 4 mM. Sin embargo, según la utilización, el límite inferior puede encontrarse también entre 0,1 y 20 mg o 50 mg. Sin embargo, según la utilización, el límite superior puede encontrarse también entre 1 mg o 2 mg y los valores máximos indicados. Una dosis diaria se administra ventajosamente en de 1 a 8 tomas, que de manera conveniente están distribuidas uniformemente durante un tiempo de vigilia de 16 horas. Un tratamiento tiene lugar convenientemente durante un periodo de tiempo de desde 1 hasta 7 días y más. La invención comprende en este sentido también dosis unitarias preparadas galénicamente, pudiendo calcularse de manera sencilla la cantidad de principio activo presente en una dosis unitaria según los intervalos anteriores de un plan de tratamiento.

Una forma de realización adicional de la presente invención se refiere a una preparación de combinación según una de las reivindicaciones 3 ó 4. A las sustancias activas que actúan de manera antiviral adicionales en la preparación de combinación según la invención pertenecen o al menos otra sustancia activa según la invención y/o al menos una sustancia activa antiviral tales como por ejemplo: amantadina (1-adamantanamina) y sus derivados, que se dirige o dirigen contra una proteína transmembrana de algunos virus de la gripe A, tales como por ejemplo la rimantadina, agentes terapéuticos para infecciones gripales, que inhiben la proteína de superficie del virus de la gripe neuraminidasa. A éstos pertenecen por ejemplo Relanza, inhibidores de la ruta de transducción de señales Raf-MEK-ERK tales como por ejemplo U0126 o inhibidores adicionales, tal como se describieron en el documento PCT/DE 01/01292, inhibidores de la ruta de transducción de señales MEKK/SEK o de los componentes de rutas de transducción de señales adicionales tal como se describieron en el documento DE 10138 912 y análogos de nucleósido sintéticos tal como por ejemplo 3-desazaadenosina y ribavirina.

La preparación de combinación puede utilizarse en forma de una mezcla o como componentes individuales para la utilización

simultánea o en distinto momento en sitios iguales o diferentes de manera sistémica o local.

La administración de la preparación de combinación puede tener lugar como mezcla de las sustancias activas. Sin embargo, 5 las sustancias activas también pueden administrarse por cada administración separadas unas de otras en el mismo sitio, o también en sitios separados unos de otros, simultáneamente o también en momentos de tiempo diferentes en el plazo de un intervalo de tiempo, en el que la sustancia administrada en 10 primer lugar aún muestra efecto, por ejemplo en un intervalo de tiempo de tres días.

La administración según la invención de la sustancia activa es la administración aerógena, es decir bronquial, de la sustancia activa para la profilaxis o el tratamiento de aquellas 15 infecciones virales, que producen la infección por vía aerógena. Para esto se usan pulverizadores y adyuvantes galénicos de la sustancia activa, tal como los conoce el experto de manera suficiente.

El experto conoce en general aditivos y adyuvantes 20 adecuados, que sirven por ejemplo para la estabilización o conservación del fármaco o producto para diagnóstico (véase por ejemplo Sucker H *et al.*, (1991) Pharmazeutische Technologie, 2ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart). Ejemplos de tales aditivos y/o adyuvantes son soluciones salinas fisiológicas, 25 solución Ringer-dextrosa, dextrosa, solución Ringer-lactato, agua desmineralizada, estabilizadores, antioxidantes, formadores de complejos, compuestos antimicrobianos, inhibidores de proteinasa y/o gases inertes.

La sustancia activa se mezcla, en condiciones estériles, 30 con un vehículo fisiológicamente aceptable y posibles conservantes, tampones o propelentes, según sea necesario. El experto conoce los vehículos de este tipo para preparaciones farmacológicas.

Preferiblemente la sustancia activa según la invención se 35 administra en una dosis única, de manera especialmente preferible en varias dosis, no superando las dosis individuales la dosis máxima tolerable (DMT) de la sustancia activa para el

ser humano. Preferiblemente se elige una dosis, que asciende a la mitad de la DMT. La dosis diaria puede administrarse una vez al día o distribuirse en varias porciones parciales a lo largo del día, preferiblemente en intervalos de tiempo aproximadamente iguales.

Ejemplo 1: Sistema de prueba para encontrar principios activos antivirales

Con ayuda de transducción retroviral de las células de epitelio pulmonar humanas A549, de las células de epitelio renal caninas MDCK y las células de mono Vero se prepararon líneas celulares, que expresaban de manera estable o bien una forma negativa dominante de la IKK (IKK KD) o bien una forma mutada que interfiere de manera dominante del inhibidor de NF- κ B, mIkB. Además se generaron también las correspondientes líneas, que expresaban una forma activa de la IKK (IKK EE). Tanto los constructos como su acción sobre la expresión génica mediada por NF- κ B en las células ya se describieron (Denk *et al* J Biol Chem 276, 28451-28458, 2001).

Para la generación de las líneas celulares estables se clonaron los correspondientes ADNc para IKK KD, mIkB e IKK EE en orientación sentido en el vector de expresión retroviral pCFG5 IEGZ (Kuss *et al.* Eur J Immunol 29, 3077-3088, 1999). Además del ARN mensajero del "gen de interés", el ADN del vector codifica además para el ARN mensajero de la "proteína verde fluorescente" (GFP), que se expresa durante la síntesis de proteínas partiendo de un sitio de unión ribosómica interno. Esto permite la identificación de células transducidas de manera estable en la citometría de flujo. Además el vector proporciona resistencia frente al antibiótico Zeocin. Los diferentes constructos de expresión así como el vector vacío se transfectaron con ayuda del método de precipitación de fosfato de calcio en la línea celular productora de virus ØNX (Grignani *et al.*, Cancer Res 58, 14-19, 1998) (Denk *et al.*, J Biol Chem 276, 28451-28458, 2001). La eficacia de transfección se controló tras 24 h mediante la expresión de GFP y estaba en el orden de magnitud

del 70-80%. Después de seleccionaron las células durante aproximadamente 2 semanas con 1 mg/ml de Zeocin en el medio.

Para la infección de las diferentes células diana (A549, MDCK, Vero) con los retrovirus recombinantes se filtraron los sobrenadantes del medio que contenían retrovirus de las líneas celulares productoras de virus, se mezclaron con 5 µg/ml de polibreno (Sigma) y se aplicaron sobre células nuevas. La infección tuvo lugar durante una centrifugación de 3 horas doble (1000xg) en dos días consecutivos. Las células transducidas de manera estable se seleccionaron 24 h tras la infección durante dos semanas más con 400-600 µg/ml de Zeocin en el sobrenadante del medio. Tras la generación que tuvo lugar de esta manera de las líneas celulares estables se infectaron tanto éstas como virus de la gripe A de tipo salvaje tal como se describe a continuación y se determinaron los títulos virales de las células, que portaban de manera estable el vector, IKK KD, mIkB e IKK EE en comparación con el título del sobrenadante de las células de tipo salvaje.

En paralelo se transfectaron de manera transitoria células MDCK con ayuda del reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Life Technologies) según métodos convencionales (Ludwig *et al.*, J Biol Chem 276, 10990-10998, 2001) con los mismos constructos. Las eficacias de transfección se encontraban a >60%. 24 h tras la transfección tuvo lugar, tal como en las líneas estables, la infección con la cepa de virus de la gripe A virus de la peste aviar (VPA) con una multiplicidad de infección de 1 (M.O.I.=1). 24 h más tras la infección se comprobaron los títulos de los nuevos virus formados en el sobrenadante del cultivo celular en ensayos en placa convencionales respecto a células MDCK. También se comparó en este caso el título viral de las células infectadas por virus de la gripe A, que se habían transfectado o bien con el vector vacío o bien con constructos que expresaban IKK KD, mIkB e IKK EE.

Se obtuvieron los siguientes resultados. La comparación de los títulos virales de células MDCK infectadas por virus de la gripe A, que se habían transfectado previamente o bien con el

vector vacío o con un constructo, que expresaba IKK KD o mIkB, mostró que en las células que expresaban IKK KD o mIkB la multiplicación de los virus tras 24 h se inhibía en un 50%-70%. De manera correspondiente se encontró en las células, que expresaban la forma activa de IKK, IKK EE, un aumento de la multiplicación de los virus. Estos resultados pudieron reproducirse en varios ensayos independientes. También pudieron obtenerse resultados correspondientes en las líneas celulares estables A549, MDCK y Vero, que expresaban IKK KD, mIkB o IKK EE, observándose los mayores efectos en las células A549 transfectadas de manera estable. En este caso, una inhibición de la activación de NF- κ B mediante IKK KD o mIkB llevó a una reducción de hasta 10 veces de los títulos virales, mientras que la activación constitutiva de la ruta de señales mediante la expresión estable de IKK EE aumentó el rendimiento viral en diez veces. Estos hallazgos muestran que la activación de IKK y NF κ B es esencial para la multiplicación del virus de la gripe y que la inhibición específica del módulo s de señal de IKK/NF- κ B lleva a una reducción significativa de la producción de virus.

Ejemplo 2: Inhibición de la activación NF- κ B viral y reducción del virus de la gripe *in vitro* con ácido acetilsalicílico (AAS)

Los salicilatos, tales como el AAS o la sulfosalazina se utilizan clínicamente de manera amplia como analgésicos y agentes antiinflamatorios. Publicaciones recientes muestran que estas sustancias son inhibidores directos y eficaces de la IKK (Yin *et al.*, Nature 396, 77-80, 1998; Weber *et al.*, Gastroenterology 119, 1209-1218, 2000) y que pueden inhibir *in vitro* la multiplicación de virus de la gripe (Huang y Dietsch, New Engl J Med 319, 797, 1988). Como control positivo servía por tanto el AAS. Se trataron células de epitelio de pulmón A549 con concentraciones crecientes de AAS en el intervalo de 0,01 mM-5 mM. Estas concentraciones se mantuvieron durante todo el experimento en el medio de cultivo. Una hora tras el tratamiento tuvo lugar la infección con la cepa de virus de la gripe A virus de la peste aviar (VPA) con una multiplicidad de infección de 1 (M.O.I.=1). 24 h más tras la infección se comprobaron los

títulos de los virus recién formados en el sobrenadante de cultivo celular en ensayos en placa convencionales respecto a células MDCK.

En un segundo ensayo se trataron células MDCK una hora
5 antes de la infección o dos y cuatro horas tras la infección con AAS 5 mM. La infección y la comprobación de los virus recién formados tuvieron lugar tal como anteriormente.

Se obtuvieron los siguientes resultados. Tras la comparación de los títulos virales de sobrenadantes de cultivo
10 de A549 24 h tras la infección de células no tratadas con AAS con células tratadas con AAS resultó una inhibición dependiente de la concentración de la multiplicación viral, que sin embargo no era clara hasta 5mM y en este caso comprendía 2 unidades logarítmicas. También pudo observarse una correspondiente acción
15 inhibidora (> 2 unidades logarítmicas) del AAS 5mM en células MDCK infectadas, provocando en este caso con una adición de AAS 4 h tras la infección todavía una reducción de los títulos virales de 10 veces.

Ejemplo 3: Acción del AAS sobre la infección gripal en ratones
20 Administración aerógena

Se infectaron ratones C57 Bl/6 con 5000 ufp/20µl o con 10.000 ufp/20 ml de virus de la gripe (virus de la peste aviar, VPA) por vía nasal. Con un inicio del tratamiento el día 0, se insertó 30 min tras la infección en los ratones con anestesia
25 (inyección i.p. de 300 µl de Ketamina/Rompún; Serum Werk Bernburg; Bayer Ag Leverkusen) un tubo traqueal y se administró, con ayuda de un aerosol (administración de 600 µl) nebulizador (Hugo Sachs Elektronik-Harvard App.GmbH March-Hugstetten) que contenía AAS 2 mM (= 0,36 mg/ml de PBS), 10 mM, 20 mM o 50 mM
30 (Sigma-Aldrich Steinheim) o para el control sólo PBS. Esta administración aerógena de las sustancias de prueba se repitió en algunos grupos los días 1, 2, 3 ó 1, 2, 5 y 6. En otros grupos se realizó el tratamiento con AAS los días 3, 4, 5, 6 tras la infección. Por grupo se trataron 5-6 animales. Se
35 determinó el peso corporal, la tasa de mortalidad y el tiempo de supervivencia. En un ensayo adicional se sacrificaron los

animales, tras el tratamiento con AAS el día 1, el día 3 y se determinó la concentración de virus en el tejido pulmonar.

Se obtuvieron los siguientes resultados. Las dosis más reducidas de AAS redujeron los virus en el pulmón de manera más clara que las dosis altas. El AAS demostró ser tóxico a partir de 20 mM (disminución del peso corporal). Mientras que en el grupo control todos los animales murieron por gripe, en los grupos tratados con dosis no tóxicas reducidas (2 mM) de AAS sobrevivieron aproximadamente el 40% la infección. Además el tiempo de supervivencia medio de los animales fallecidos tras AAS en comparación con el grupo control era claramente mayor.

Los resultados de experimentos *in vivo* según este ejemplo muestran que la administración aerógena diaria única o múltiple (hasta 3 veces) de AAS en una dosis no tóxica reducida, es decir en dosis de desde 0,1 mg/kg hasta 300 mg/kg de peso corporal, en particular de 10 mg/kg a 100 mg/kg, preferiblemente de 20 mg/kg a 50 mg/kg, por ejemplo 30 mg/kg, lleva a una acción terapéutica clara contra una enfermedad mortal inducida mediante la administración nasal del virus de la gripe. A este respecto la formulación debería seleccionarse de tal manera que la composición farmacéutica que vaya a administrarse por vía aerógena AAS se encuentre en concentraciones por debajo de 2 mM, preferiblemente de 0,01 mM a 1,99 mM, lo más preferiblemente de 0,1 mM o 0,5 mM a 1,5 mM, por ejemplo 1 mM. La cantidad de fase líquida del aerosol debe calcularse y ajustarse a este respecto de manera correspondiente a las dosis diarias indicadas anteriormente teniendo en cuenta la concentración utilizada en la fase líquida. Esto último puede conseguirse por ejemplo con dispositivos de pulverización convencionales, que pulverizan cantidades definidas de una disolución para dar un aerosol.

REIVINDICACIONES

1. Uso de ácido acetilsalicílico (AAS) para la producción de una composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad viral, en el que se inhibe un componente de la ruta de transducción de señales NF-kB de tal manera que se inhibe una multiplicación de los virus, en que se prepara la composición farmacéutica para la administración bronquial como aerosol, y en que la dosis diaria se encuentra, con respecto al AAS, para el ser humano en el intervalo de desde 0,1 hasta 70 mg.
2. Composición farmacéutica para la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad viral que contiene AAS, en que se administra el principio activo por vía aerógena en concentraciones de desde 0,1 hasta 4 mM.
3. Forma de realización según la reivindicación 1 ó 2, en la que la enfermedad viral está provocada por una infección por virus de ARN o ADN, preferiblemente virus de la gripe.
4. Forma de realización según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la composición farmacéutica contiene adicionalmente una sustancia activa de entre "sulindaco, sulindaco-sulfóxido, sulindaco-sulfona, sulindaco-sulfuro, análogos de sulindaco-bencilamida, ácido salicílico, salicilamida, salacetamida, etenzamida, diflunisal, olsalazina o salazosulfapiridina, curcumina, pirrolidinditiocarbamato (PDTC), oxicamos tales como por ejemplo piroxicamo, pentametilhdroxicromano (PMC), 17-beta-estradiol, polifenoles del té, tales como por ejemplo (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), Bay11-7182, PS-341, lactacistina y secuencias de nucleótidos antisentido específicas para p65 o p50".
5. Forma de realización según la reivindicación 4, en la que la sustancia activa es 1-adamantanamina, rimantadina, un inhibidor de neuraminidasa o un análogo de nucleósido, tal como ribavirina.