



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0815748-0 B1



(22) Data do Depósito: 22/08/2008

(45) Data de Concessão: 24/04/2019

(54) Título: USO DE IOTA-CARRAGENINA EM UMA QUANTIDADE ANTIVIRAL EFICAZ

(51) Int.Cl.: A61K 31/431; A61K 31/737; A61P 31/14; A61P 31/16; A61P 31/20.

(30) Prioridade Unionista: 24/08/2007 US 60/935668.

(73) Titular(es): MARINOMED BIOTECHNOLOGIE GMBH.

(72) Inventor(es): ANDREAS GRASSAUER; EVA PRIESCHL-GRASSAUER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2008006910 de 22/08/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/027057 de 05/03/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 23/02/2010

(57) Resumo: USO DE IOTA-CARRAGENINA EM UMA QUANTIDADE ANTIVIRAL EFICAZ A presente invenção fornece o uso de iota e/ou capacarragenina para a produção de uma composição farmacêutica antiviral para a profilaxia ou tratamento de uma doença ou condição patológica causada por ou associada a uma infecção por um vírus respiratório selecionado do grupo consistindo de ortomixovírus, paramixovírus, adenovírus e coronavírus. A presente invenção ainda fornece o uso do fucoidan, em particular fucoidan de alto peso molecular, para a produção de uma composição farmacêutica antiviral para a profilaxia ou tratamento de uma doença ou condição patológica causada por ou associada a uma infecção por um vírus respiratório selecionado do grupo consistindo de ortomixovírus e paramixovírus.

“USO DE IOTA-CARRAGENINA EM UMA QUANTIDADE ANTIVIRAL EFICAZ”

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção se relaciona a polissacarídeos sulfatados selecionados de um grupo de carrageninas e fucoidans e composições farmacêuticas feitas destes, onde os ditos polissacarídeos sulfatados estão presentes como ingredientes antivirais ativos, para uso médico ou veterinário na prevenção ou tratamento de doenças causadas por ou associadas com um vírus entrando no corpo de um indivíduo via trato respiratório, sendo o vírus selecionado de um grupo de ortomixovírus, paramixovírus, adenovírus e coronavírus.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os ortomixovírus são vírus de RNA, sendo os membros mais proeminentes as espécies de vírus da influenza. Os vírus A e B da influenza são os dois tipos de vírus da influenza que causam doenças humanas epidêmicas. Eles são tipicamente espalhados de pessoa a pessoa, principalmente através de transmissão respiratória por gotículas.

A família paramixovírus inclui vírus respiratório sincicial (RSV), o vírus da parainfluenza e o metapneumavírus. As infecções do RSV e vírus da parainfluenza podem causar sérias infecções respiratórias em menores e crianças jovens mas podem também causar doenças severas em pessoas idosas e adultos tendo deficiência no sistema imunológico.

Entre as espécies de vírus de parainfluenza humana quatro membros são conhecidos por causar sérias doenças respiratórias em crianças para as quais presentemente não há prevenção ou terapia efetivas disponíveis, os quatro membros sendo os vírus da parainfluenza do 1 ao 4. Acredita-se que os surtos de vírus da parainfluenza e RSV contribuem substancialmente para a hospitalização e taxas de mortalidade aumentadas. Pacientes com deficiência nos sistemas imunológico, cardíaco ou pulmonares estão em risco maior de se

depararem com sérias complicações que se seguem pela infecção por paramixovírus e irão portanto se beneficiar de uma terapia antiviral.

O vírus respiratório sincicial (RSV), o qual é o patogênico respiratório mais difundido tipicamente afligindo indivíduos durante a juventude e infância mundialmente, causa surtos anuais de pneumonia e bronquiolite durante o período de inverno e começo da primavera. A bronquiolite e pneumonia do RSV requerem a hospitalização de centenas de milhares de jovens todo ano. Proteção passiva contra o RSV está disponível ao menos em parte em uma taxa relatada de 55 % de sucesso perante a injeção intramuscular mensal do anticorpo anti-RSV monoclonal humanizado palivizumabe (Synagis®).

A família dos coronavírus inclui o coronavírus e o torovírus. Os coronavírus são conhecidos por infectarem o trato respiratório superior e o trato gastrointestinal em mamíferos e aves. Acredita-se que os coronavírus causam um alto percentual de todos os resfriados comuns em adultos humanos.

Os adenovírus são vírus de DNA os quais tipicamente infectam o trato respiratório superior. No presente, mais de 50 diferentes serotipos de adenovírus humanos são conhecidos, agrupados em seis subtipos de A a F, os quais são responsáveis por 5 – 10 % de infecção respiratória superior em crianças.

Em vista do supracitado acredita-se que exista uma forte necessidade de uma potente composição farmacêutica antiviral que seja facilmente aplicável e efetiva na prevenção ou tratamento de infecções respiratórias virais causadas por membros das famílias dos paramixovírus, ortomixovírus, coronavírus e/ou adenovírus.

Polissacarídeos sulfatados incluindo carrageninas e fucoidan são conhecidos por sua eficácia antiviral por décadas. Conseqüentemente, a arte anterior está repleta de artigos científicos sobre os efeitos antivirais de

carrageninas. Em uma revisão das mais interessantes, Gonzalez M.E. et al. (1987, Antimicrob. Agents Chemother. 31, 1388-1393) relatam uma eficácia antiviral de diferentes polissacarídeos sulfatados incluindo a iota-carragenina contra vários vírus animais. A iota-carragenina demonstrou atividade antiviral
5 contra os vírus envelopados HSV-1, HSV-2, o vírus Semliki Forest (SFV), o vírus vaccinia e o vírus da gripe suína africana (ASF) e contra o vírus da encefalomiocardite (EMC) não-envelopado. A iota-carragenina não teve efeito nos vírus envelopados da estomatite vesicular (VSV) e sarampo e nos vírus não-envelopados da polio tipo 1 e adenovírus tipo 5.

10 A US Patent 4,783,446 revela uma atividade antiviral das iota, capa e lambda-carrageninas contra infecção retroviral, em particular contra a infecção pelo vírus da leucemia de células T humanas (HTLV) III.

A WO 88/06396 revela um método para o tratamento de infecções retrovirais, incluindo a infecção com HIV, pela administração de
15 uma carragenina ou uma mistura de carrageninas.

Girond et al. (1991, Research Virol. 142, 261-270) revelam que policssacarídeos sulfatados como a iota, capa, e lambda-carrageninas têm uma atividade inibitiva efetiva contra a replicação do vírus da hepatite A (HAV).

20 Baba M. et al. (1988, Antimicrob. Agents Chemother. 32, 1742-1745) revelam vários polissacarídeos sulfatados incluindo sulfato de dextrano, polissulfato de pentosano, fucoidan e carragenina como sendo potentes inibidores do HSV-1, HSV-2, citomegalovírus humano (CMV), vírus da estomatite vesicular, vírus Sindbis e HIV-1. Por outro lado, estes
25 polissacarídeos sulfatados foram testados e são inativos contra o coxsackievírus, poliovírus e vírus da parainfluenza.

A EP 0293826 revela a aplicação terapêutica e profilática de polissacarídeos sulfatados tais quais o fucoidan e as carrageninas para inibir o HIV-1 in vitro.

A Patente US 5.658.893 revela um método para inibição da infecção de células humanas por rotavírus pelo contato do rotavírus com a lambda-carragenina. É ainda revelado que a iota e a capa-carragenina não exibem atividade anti-rotaviral.

5 A US 2003/181415 A revela que polissacarídeos sulfatados, incluindo sulfato de celulose, são conhecidos como efetivos contra vários vírus envelopados e em particular contra o vírus da herpes simplex (HSV), vírus de Papilloma e o HIV.

10 O fucoïdan é um polissacarídeo sulfatado principalmente extraído de várias espécies de algas marrons. Há dois tipos de fucoïdan de grau farmacológico disponíveis no mercado, uma fração de fucoïdan de alto peso molecular (HMWF) tendo um peso molecular médio alcançando de por volta 1.000.000 a 2.000.000 Da (por exemplo Kraeber, Alemanha) e uma fração de fucoïdan de baixo peso molecular (LMWF) tendo um peso molecular médio de 8.200 Da. O F-fucoïdan é principalmente composto de de 15 ésteres sulfatados de fucose, enquanto que o U-fucoïdan é composto de por volta de 20 % de ácido glucurônico.

Carragenina é um termo genérico para polissacarídeos lineares sulfatados baseados em galactose extraídos de algas (rhodophyceae). É 20 principalmente usada como um espessante, gelificante, estabilizador ou emulsificante em produtos farmacêuticos ou alimentícios. Existem mais de 10 carrageninas estruturalmente diferentes, sua natureza dependendo no gênero da alga da qual elas foram extraídas. Os três principais tipos são a iota, a capa e a lambda-carragenina, que diferem ligeiramente em suas estruturas e grau de sulfatação. A iota-carragenina é um galactano sulfatado formador de gel leve 25 predominantemente extraído das algas vermelhas *Gigartina stellate* e *Chondrus crispus*. A capa-carragenina gera géis fortes e rígidos e é predominantemente produzida da *Capaphycus cottonii*. A lambda-carragenina, que é a forma mais comum, é freqüentemente usada para

engrossar laticínios.

Apesar do longo conhecimento da atividade antiviral das carrageninas contra vírus tais quais, por exemplo HIV, HSV, HAV, HTLV, ou HPV, o mecanismo de como as carrageninas exibem atividade antiviral
5 ainda precisa de mais esclarecimento.

Por exemplo, Baba M. et al. (1988, *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1742-1745) especulam que polissacarídeos sulfatados incluindo a capa e a lambda-carragenina inibem ou ao menos contribuem para a inibição da adsorção do vírus de diversos vírus envelopados à superfície das
10 células hospedeiras. Similarmente, a US 2005/0261240 assume que a carragenina pode não especificamente se ligar a um vírus assim bloqueando os sítios receptores dos vírus. Damonte E. B. et al. (2004, *Curr. Med. Chem.* 11, 2399-2419) revelam que polissacarídeos sulfatados podem imitar o sulfato de heparina celular e então bloquear os sítios receptores virais responsáveis
15 pela interação inicial entre o vírus e célula hospedeira, onde Gonzalez M. E. et al. (1987, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1388-1393) descobriram, usando partículas de vírion rotuladas, que vírions de HSV-1 são internalizados mesmo na presença de altas concentrações de iota-carragenina. Eles sugerem que ao menos para HSV-1 a carragenina inibe um passo na
20 replicação do vírus subsequente à anexação e entrada na célula mas ainda anterior à síntese de proteínas virais posteriores.

Turner E. V. Sonnenfeld G. (1979, *Infection and Immunity* 25, 467-469) revelam uma atividade antiviral da lambda mas não capa-carragenina contra o vírus da estomatite vesicular bovina que atividade
25 antiviral é devido à imunomodulação, i.e. à indução de interferon.

Em conclusão, pode-se resumir tomando as palavras da US 5,658,893, que “em vista das diferentes respostas por diferentes vírus a polissacarídeos sulfatados, é claro que a resposta de um vírus particular a carragenina não pode ser prevista com certeza sem experimentação. O

mecanismo pelo qual polissacarídeos sulfatados, particularmente as carrageninas, inibem a replicação e infectividade virais pode não ser uniforme como diferentes investigadores relataram descobertas contraditórias quando trabalhando com diferentes tipos de vírus e células. Não seria óbvio a um perito que uma substância tal qual um polissacarídeo sulfatado que seja um inibidor efetivo de um vírus demonstrasse similar eficácia contra outro vírus.”

À luz do que precede, a presente invenção agora fornece uma composição antiviral baseada em carragenina e/ou fucoidan adequada ao tratamento profilático ou terapêutico de infecções respiratórias virais causadas por membros das famílias paramixovírus, ortomixovírus, adenovírus e/ou coronavírus. Contrário à revelação de Fujisawa H. et al. (1987, J. gen. Virol. 68, 425-423), quem relata que a administração intranasal de carragenina não reduziu a dose do vírus da influenza A em ratos mas ao contrário ainda aumentou a suscetibilidade dos animais ao vírus dependendo da quantidade de vírus usada para a infecção, foi agora surpreendentemente descoberto que a carragenina, em particular iota e capa-carragenina, tem de fato eficácia antiviral contra vários membros de ortomixovírus, paramixovírus, adenovírus e coronavírus.

Adicionalmente, foi surpreendentemente descoberto que o fucoidan, particularmente a fração do fucoidan de alto peso molecular (HWMF), tem eficácia antiviral contra vários membros dos ortomixovírus e paramixovírus.

Conseqüentemente, a presente invenção visa fornecer uma composição farmacêutica antiviral adequada para a prevenção ou tratamento de infecções do trato respiratório causadas por um vírus selecionado do grupo consistindo de ortomixovírus, paramixovírus, adenovírus e coronavírus, assim como para doenças ou condições patológicas associadas a tais infecções virais primárias, tais doenças ou condições contendo infecções virais ou bacterianas secundárias assim como sintomas corporais tipicamente associados com

qualquer infecção primária ou secundária incluindo sintomas tais quais febre, dor, tontura, tremores, sudorese, e/ou desidratação.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Em uma primeira modalidade a presente invenção se relaciona
5 ao uso da carragenina como um ingrediente antiviral ativo na manufatura de uma composição farmacêutica para a profilaxia ou tratamento de uma doença ou condição patológica causada por ou associada com uma infecção por um vírus respiratório, onde o dito vírus respiratório inclua ao menos uma proteína anexada a ou integrada em sua membrana viral, a proteína capaz de se ligar a
10 uma célula hospedeira via receptor tendo ao menos um grupo açúcar, o vírus respiratório sendo selecionado do grupo consistindo de ortomixovírus e paramixovírus e a carragenina sendo selecionada do grupo consistindo de iota e capa-carragenina.

Uma “célula hospedeira” a que aqui se refere é qualquer célula
15 eucariótica que seja naturalmente, i.e. sob condições naturais ou como naturais, que são alvo e penetradas por quaisquer vírus aos quais referência será feita a seguir. Por motivos experimentais e laboratoriais é estado da arte usar linhas de células hospedeiras que são tipicamente reconhecidas como modelos in vitro adequados para testar a eficácia de agentes fisiologicamente
20 ativos e os quais permitem ao menos alguma predictibilidade dos resultados com respeito a aplicações humanas comparáveis.

A presente invenção ainda se relaciona a uma composição farmacêutica contendo a iota e/ou a capa-carragenina como um ingrediente antiviral ativo e a aplicações destes na prevenção ou tratamento de doenças
25 causadas por ou associadas a um vírus entrando no corpo de um indivíduo via trato respiratório, onde o dito vírus inclua ao menos uma proteína anexada a ou integrada em sua membrana viral, a proteína capaz de se ligar a uma célula hospedeira via receptor tendo ao menos um grupo açúcar, e o vírus sendo selecionado do grupo consistindo de ortomixovírus e paramixovírus.

O termo “ingrediente antiviral ativo” como utilizado aqui se refere a um composto que seja diretamente ou indiretamente efetivo em especificamente interferir com ao menos uma ação viral selecionada do grupo consistindo de penetração do vírus em células eucarióticas, replicação de vírus em células eucarióticas, agrupamento de vírus, liberação de vírus de células eucarióticas infectadas, ou que seja efetivo em não especificamente inibir um aumento de dose de vírus ou em não especificamente reduzir o nível de dose de um vírus em um sistema hospedeiro eucariótico ou mamífero. Ele também se refere a um composto que previne de ou reduz a probabilidade de se pegar uma infecção viral.

A presente composição farmacêutica pode ser administrada, como for o caso, antes ou depois do aparecimento de uma infecção viral, i.e. por motivos de tratamento profilático ou terapêutico, ou por ambas administrações profilática e terapêutica.

O termo “profilaxia” ou “tratamento profilático” se relacionam à administração da presente composição farmacêutica a um indivíduo saudável a fim de reduzir a dita suscetibilidade de um indivíduo a uma infecção viral.

O termo “terapia” ou “tratamento terapêutico” como usado aqui se relaciona à administração da presente composição farmacêutica a fim de alcançar uma redução na severidade e/ou frequência dos sintomas, eliminação dos sintomas e/ou da causa subjacente, prevenção da ocorrência dos sintomas e/ou sua causa subjacente, e/ou melhoria ou remediação do dano diretamente por ou indiretamente associado, por exemplo através de infecção secundária, com a infecção viral.

Sabe-se que os ortomixos e paramixovírus e diversos outros vírus se anexam à célula hospedeira via ligação dos receptores presentes na superfície da célula hospedeira, os receptores tipicamente sendo glicoproteínas ou glicolipídios contendo resíduos de açúcar incluindo ácido

siálico (ácido N-actil neurâmico) e resíduos de sulfato de heparano.

No caso de ortomixovírus, por exemplo o vírus da influenza, os vírions se ligam a resíduos de ácido siálico. Os vírus da influenza humana preferencialmente se ligam a resíduos de ácido siálico tendo uma ligação alfa 2-6, onde o vírus da influenza aviária preferencialmente se liga a resíduos de ácido siálico tendo ligação alfa 2-3.

A captação celular de um paramixovírus envolve ao menos duas de suas glicoproteínas integrais de membrana. Uma delas, tipicamente selecionada de um grupo de glicoproteínas HN, H e G, está envolvida em adesão celular e a outra glicoproteína, i.e. glicoproteína F, está envolvida na mediação da fusão pH-independente do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. Por exemplo, respirovírus e rubulavírus se ligam aos resíduos de ácido siálico de receptores glicoproteína ou glicolípido da célula hospedeira.

A adesão do RSV não é totalmente compreendida mas a adesão à célula hospedeira mais provavelmente envolve interação com o sulfato de heparano, um glucosaminoglicano que é parte da matriz extracelular.

Juntamente a revelar a presente invenção foi observado in vitro que a exposição de células hospedeiras à carragenina, em particular iota e/ou capa-carragenina, pode alterar a estrutura da superfície da célula de uma dita célula hospedeira, presumidamente por causar mudanças conformacionais na estrutura tridimensional de certos receptores de superfície de célula ou por mascarar e/ou modificar os ditos receptores.

Surpreendentemente, esta mudança na superfície da célula hospedeira preveniu a adesão de ortomixovírus e paramixovírus às células hospedeiras mesmo após a remoção da carragenina das células hospedeiras, i.e. na ausência de carragenina no momento do desencadeamento artificial de uma infecção pela inoculação in vitro.

Este efeito antiviral particular da carragenina foi observado enquanto a infecção desencadeada artificialmente foi iniciada com até por volta de duas horas após a remoção do polímero das células hospedeiras, indicando um efeito relativamente de longa duração das mudanças estruturais na superfície celular causadas pela interação com a carragenina.

Em contraste com os paramixo e ortomixovírus, um efeito protetor na ausência da carragenina no momento de desencadear a infecção não foi observado para outros vírus incluindo rinovírus e coronavírus, enquanto a proteção foi apenas alcançada na presença da carragenina.

Portanto e em vista da eficácia antiviral comprovada experimentalmente da carragenina contra a infecção do rinovírus, está concluído que com o rinovírus e provavelmente outros vírus também, o efeito antiviral pode se dever à adesão do polímero da carragenina aos vírions em vez de interação química ou física do polímero com os receptores da célula hospedeira.

Como mencionado aqui antes que as composições de carragenina da presente invenção possam ser aplicadas com sucesso contra a infecção por ortomixovírus, incluindo infecções causadas pelos vírus da influenza A ou B, e especialmente onde os ditos vírus da influenza A ou B sejam vírus humanos que se liguem a uma célula hospedeira via ligação 2-6 ao ácido siálico. As infecções pelo vírus da influenza humana são melhor tratadas usando-se predominantemente ou somente a iota-carragenina ou fucoidan como os ingredientes antivirais ativos.

A carragenina pode, contudo, também ser aplicada com sucesso contra infecções onde o dito vírus da influenza A for um vírus aviário que se ligue a uma célula hospedeira via ligação 2-3 de ácido siálico. Neste último caso, a capa-carragenina mostrou-se a mais eficaz carragenina, o uso do qual é portanto de preferência em conexão com a profilaxia ou tratamento terapêutico do vírus aviário. Ao passo que descobriu-se que a iota-carragenina

e o fucoidan são bem menos ativos ou mesmo inativos perante o vírus da influenza A aviária.

As espécies paramixovírus de que se sabe serem suscetíveis ao tratamento com carragenina são selecionadas do grupo consistindo do vírus da parainfluenza humana (HPV) tipo 1, HPV tipo 2, HPV tipo 3, HPV tipo 4 e RSV. Onde o paramixovírus selecionado for o RSV é de preferência que a iota-carragenina ou fucoidan sejam aplicados como o ingrediente polissacarídeo sulfatado predominante ou sozinho para administração profilática ou terapêutica, porque a iota-carragenina e o fucoidan produziram os melhores resultados nos arranjos experimentais.gotas líquidas

As condições patológicas ou doenças a que se refere aqui em conexão com a administração profilática ou terapêutica da carragenina contemplam bronquite aguda, bronquite crônica, rinite, sinusite, laringotraquiobronquite, bronquiolite aguda, faringite, amigdalite, laringite, traqueíte, asma e pneumonia.

A carragenina é especialmente adequada para aplicação tópica para tratar inflamações da pele ou mucosas. A carragenina utilizável para aplicação tópica à pele ou mucosas de acordo com a presente invenção tem um peso molecular indo de por volta de 15.000 a 5.000.000 Da, as frações tendo pesos moleculares médios de mais de 50.000 Da, e especialmente frações tendo pesos moleculares médios na faixa de 50.000 a 3.000.000 Da são particularmente de preferência.

A administração sistêmica, por exemplo parenteral ou oral é possível, também, especialmente usando polímeros de peso molecular mais baixo tendo peso molecular médio na faixa de 15.000 a 100.000 Da.

A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção ajustada para uso parenteral pode ser provida como uma preparação selecionada do grupo de loções para a pele, cremes, pomadas, géis, pós incluindo pós para inalação, sprays, espumas, gotas líquidas ou soluções de

gargarejo. As preparações de carragenina podem, contudo também ser ajustadas para administração oral, por exemplo como soluções líquidas, ou preparações semi-sólidas ou sólidas tais quais pós secos, tabletes, cápsulas, drágeas ou qualquer outra forma galênica oralmente ingerível. As
5 composições farmacêuticas para aplicação às mucosas incluem sprays ou gotas de nariz e qualquer outro sistema de distribuição de drogas nasal conhecido na arte como revelado, por exemplo, na US 6.391.452.

Onde a composição for para uso tópico e for líquida ou semi-sólida ela tipicamente contém em sua forma pronta para uso carragenina em
10 uma quantidade de entre 0,01 e 10 %, preferencialmente entre 0,01 e 5 %, mais preferivelmente entre 0,1 e 2 % em peso, relativo ao volume total da composição. Onde a composição for sólida ela tipicamente contém em sua forma pronta para uso carragenina em uma quantidade de 0,01 a 10 %, preferencialmente entre 0,01 e 5 %, mais preferencialmente entre 0,1 e 2 %
15 em peso relativo ao peso total da composição.

As carrageninas utilizáveis na presente invenção estão comercialmente disponíveis mas podem também ser preparadas pela extração de algas conforme procedimentos de extração conhecidos da arte.

Se não indicado de outra maneira o termo “carragenina” como
20 usado aqui se refere a tanto iota, ou capa-carragenina ou uma mistura de ambas.

A carragenina da presente invenção pode ainda ser um homopolímero ou um heteropolímero. Um homopolímero de carragenina é constituído de subunidades de apenas um tipo de tanto iota, ou capa-carragenina, ao passo que um heteropolímero de carragenina contém
25 subunidades de ambas ditas carrageninas.

Uma “mistura” de carrageninas pode assim também se referir a uma composição de matéria contendo uma mistura de diferentes subunidades de carragenina como parte de ao menos uma carragenina heteropolimérica

presente na dita composição.

Tipicamente, as composições farmacêuticas antivirais de acordo com a presente invenção são substancialmente livres de carrageninas que não sejam iota ou capa-carragenina, i.e. incluam tanto iota ou capa-carragenina, ou uma mistura de ambas, em uma quantidade de 80 % ou mais, preferencialmente de 90 % ou mais, e especialmente de até 99 % (w/w) ou mais, relativo ao peso seco de todas as carrageninas presentes na composição.

Para algumas aplicações a composição é substancialmente constituída somente de iota-carragenina, enquanto que para outras aplicações a composição pode conter mais de 50 %, preferencialmente mais de 70 %, e especialmente até mais de 95 % (w/w) em peso seco de iota-carragenina, relativo ao peso seco total de todas as carrageninas presentes na composição.

Ainda para outras aplicações pode ser útil que a composição inclua mais de 50 %, preferencialmente mais de 70 %, e especialmente até mais de 95 % (w/w) em peso seco de capa-carragenina, relativo ao peso seco total de todas as carrageninas presentes na composição.

Onde a composição contiver ao menos uma carragenina heteropolimérica os valores numéricos dados acima se relacionam aos percentuais das respectivas subunidades de carragenina.

As composições antivirais de carragenina de acordo com presente invenção podem ainda conter ao menos um veículo farmacêuticamente aceitável e/ou aditivo adequado e permitido para aplicação médica.

O veículo pode ser um diluente, por exemplo água, soro fisiológico, opcionalmente soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS), um excipiente, ou outro veículo o qual facilite a administração da composição. Onde a composição for sólida, semi-sólida ou fluida os grupos de veículos e aditivos, respectivamente, podem conter mas não estão limitados a SiO_2 , TiO_2 , um aglutinante tal qual celulose microcristalina, polivinilpirrolidona,

goma tragacanto, gelatina, amido, lactose, mono-hidrato de lactose, ácido algínico ou amido de milho; um lubrificante ou surfactante como estearato de magnésio ou lauril sulfato de sódio; um deslizante como por exemplo dióxido de silício coloidal; um agente adoçante tal qual a sucrose ou sacarina.

5 Ainda mais aditivos podem ser selecionados do grupo consistindo de preservativos fisiologicamente aceitáveis, sais de metais alcalinos aceitáveis farmacêuticamente como cloretos de sódio, potássio, lítio, ou amônio, tampões ou agentes ajustadores de pH tais quais ácido cítrico, ácido acético, ácido fumárico, ácido clorídrico, ácido málico, ácido nítrico,
10 ácido fosfórico, ácido propiônico, ácido sulfúrico e ácido tartárico, e combinações dos ditos ácidos.

Para muitas aplicações é útil que a composição inclua cloreto de sódio como um aditivo.

 Tipicamente, um sal farmacêuticamente aceitável está presente
15 na composição em uma quantidade de não mais que 1 %, preferencialmente não mais que 0,6 % (w/v).

Nas composições da presente invenção a carragenina propriamente dita pode estar presente como um sal, também, preferencialmente como um sal de sódio.

20 É de preferência que as presentes composições para aplicações médicas profiláticas ou terapêuticas sejam fornecidas como preparações estéril, livre de germes, livres de patogênicos, livres de pirogênio e/ou livres de alérgenos.

 Verificou-se que a carragenina é não tóxica na administração
25 oral ou dermatológica, ou na inalação, mesmo quando aplicada em doses extremamente altas. Foi portanto classificada como “geralmente reconhecida como segura” (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA).

A carragenina, especialmente a iota-carragenina, pode também ser usada como um agente antiviral efetivo contra infecções de ortomixovírus

e paramixovírus em vários produtos medicinais juntamente com outros compostos ativos fisiologicamente ou drogas como principais ingredientes ativos, donde o papel da carragenina inclui seu uso como um veículo ou como um aditivo tal qual um emulsificante ou agente modificador de viscosidade. É compatível com a maioria das preparações farmacêuticas sem causar efeitos colaterais indesejados.

Está portanto dentro do escopo da presente invenção fornecer composições farmacêuticas contendo carragenina como um aditivo, mais especificamente como um antiviral, particularmente anti-paramixoviral ou anti-ortomixoviral, adjuvante a medicamentos que são tipicamente aplicados na profilaxia ou terapia de doenças infecciosas e/ou inflamatórias, alergias e/ou condições de um sistema imunológico em deficiência ou suprimido. Em particular, está dentro do escopo da presente invenção usar a carragenina, preferencialmente a iota-carragenina, como um efetivo adjuvante anti-vírus da influenza em combinação com medicamentos úteis na profilaxia ou terapia de doenças infecciosas e/ou inflamatórias, alergias e/ou condições de um sistema imunológico em deficiência ou suprimido.

Foi observado que a carragenina pode também ter atividade imunomoduladora, particularmente atividade fortalecedora do sistema imune. Ainda não está claro, contudo, se esta atividade está diretamente associada com a interferência fisiológica da substância ou indiretamente através de sua eficácia antiviral.

A composição da presente invenção será usualmente formulada em preparações para uso tópico ou nas mucosas, preferencialmente selecionado dentre sprays, particularmente sprays para nariz, pós, gotas, soluções de gargarejo, espumas, géis, cremes, pomadas, loções, losangos, e afins. Contudo, a composição farmacêutica da presente invenção pode também revestir superfícies sólidas de itens de higiene e sanitários tais quais, por exemplo, artigos de higiene ou sanitização faciais que sejam

tipicamente usados nas áreas oral e/ou nasal incluindo mas não limitando-se a lenços de papel ou papéis nasais, e lenços.

5 Mais especificamente, a composição farmacêutica pode ser aplicada, por exemplo borrifada – bem como desinfetantes – em luvas, lenços de papel ou papéis de higiene, incluindo lenços de papel e papéis nasais, a fim de se exercer um efeito virucida ao menos até certo ponto, assim contribuindo para a redução da auto-infecção repetida de um indivíduo pelas pontas dos dedos contaminadas e também reduzir a distribuição viral entre diferentes indivíduos que estão em contato próximo, por exemplo, mão a mão uns com
10 os outros.

Outros itens revestidos, impregnados ou ensopados com uma composição farmacêutica em uma base de carragenina contemplam hastes flexíveis, máscaras anti-poeira ou máscaras faciais médicas ou sanitárias. Até mesmo batons podem ser formulados para conter uma quantidade antiviral
15 efetiva de carragenina. Estes artigos de higiene e sanitização podem ser usados profilaticamente ou para tratamento terapêutico contra uma infecção viral e podem assistir na prevenção ou redução do risco de infecção.

É um objetivo da presente invenção fornecer composições antivirais baseadas em carragenina para a profilaxia ou tratamento terapêutico
20 de indivíduos especialmente suscetíveis a ou em alto risco de infecção por ortomixo ou paramixovírus incluindo pacientes de alto risco selecionados do grupo consistindo de pacientes COPD, pacientes de asma, indivíduos sofrendo de alergias, ou para sistemas imune, cardíaco, ou pulmonar deficientes, e pacientes transplantados.

25 De acordo com a presente invenção a carragenina pode também ser usada como um ingrediente antiviral ativo na produção de uma composição farmacêutica para a profilaxia ou tratamento terapêutico de uma doença ou condição patológica causada por ou associada a uma infecção por um vírus respiratório sendo selecionado do grupo consistindo de adenovírus e

coronavírus, o adenovírus preferencialmente sendo adenovírus do tipo B (Ad50).

5 Infecções por adenovírus e coronavírus são melhor tratadas usando-se composições onde a iota-carragenina seja o único ou predominante ingrediente antiviral ativo.

Ensaio experimentais ainda confirmaram que também o fucoidan é utilmente aplicado como um ingrediente antiviral ativo na produção de uma composição farmacêutica efetiva para a profilaxia ou tratamento de condições patológicas ou doenças causadas por ou associadas a
10 uma infecção por vírus respiratório, o vírus respiratório selecionado do grupo consistindo de ortomixo e paramixovírus. Neste contexto, o ortomixovírus é tipicamente o vírus da influenza A ou B, e o paramixovírus é tipicamente RSV.

Uma composição baseada em fucoidan em sua forma pronta
15 para uso para administração oral ou tópica pode conter fucoidan em uma quantidade entre 0,01 e 10 %, preferencialmente entre 0,01 e 5 %, mais preferencialmente entre 0,1 e 2 % peso por volume (w/v) ou peso por peso (w/w) dependendo se a composição for líquida ou semi-sólida (percentuais w/v) ou sólida (percentuais w/w). Pode ainda conter ao menos um veículo
20 e/ou aditivo farmacêuticamente aceitável, assim como outras substâncias ou drogas fisiologicamente ativas. Por exemplo, o cloreto de sódio é freqüentemente usado como um aditivo. Em geral, os sais farmacêuticamente aceitáveis podem estar presentes nas composições de fucoidan em uma quantidade de não mais que 1 %, preferencialmente não mais que 0,6 %.

25 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Fig. 1 mostra a eficácia da iota-carragenina em reduzir a formação de placas do vírus da influenza A/Chile/1/93 H1N1 em células MDCK em diferentes doses indo a uma concentração final de 0,1 a 100 µg/ml.

Ordenada = percentual de formação de placa após a infecção das células MDCK com a suspensão do vírus da influenza A/Chile/1/93 H1N1 contendo diferentes concentrações de iota-carragenina relativa à formação de placa de células MDCK infectadas com a suspensão do vírus da influenza A/Chile/1/93 H1N1 sem a iota-carragenina (ajustada a 100 %);
5 abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão do vírus em $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 2 mostra a eficácia da iota-carragenina em reduzir a formação de placas do vírus da influenza A/Aichi2/1/68 H3N2 em células MDCK em diferentes doses indo a uma concentração final de 75 a 300 $\mu\text{g/ml}$.
10

Ordenada = percentual de formação de placa após a infecção das células MDCK com a suspensão do vírus da influenza A/Aichi2/1/68 H3N2 contendo diferentes concentrações de iota-carragenina relativa à formação de placa de células MDCK infectadas com a suspensão do vírus da influenza A/Aichi2/1/68 H3N2 sem a iota-carragenina (ajustada a 100 %);
15 abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão do vírus em $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 3 mostra a eficácia da iota-carragenina em reduzir a formação de placas do vírus da parainfluenza 3 em células Hep-2 em diferentes doses indo a uma concentração final de 0,1 a 100 $\mu\text{g/ml}$.
20

Ordenada = percentual de formação de placa após a infecção das células Hep-2 com a suspensão do vírus da parainfluenza 3 contendo diferentes concentrações de iota-carragenina relativa à formação de placa de células Hep-2 infectadas com a suspensão do vírus da parainfluenza 3 sem a iota-carragenina (ajustada a 100 %); abscissa = diferentes concentrações
25 finais de iota-carragenina na suspensão do vírus em $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 4 mostra a eficácia do pré-tratamento com iota-carragenina em reduzir a formação de placas do vírus da parainfluenza 3 em células HeLa em diferentes doses indo a uma concentração final de 13 a 400

µg/ml.

Ordenada = percentual de formação de placa após a infecção das células HeLa pré-tratadas (pré-incubação por 3 h com iota-carragenina; subsequente remoção do polímero) com a suspensão do vírus da parainfluenza 3 relativo à formação de placa de células HeLa não tratadas (sem a pré-incubação com a iota-carragenina) (ajustada a 100 %); abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina no meio da pré-incubação em µg/ml. C = células pré-incubadas com o polímero carboximetilcelulose (controle negativo).

Fig. 5 mostra os resultados de um experimento de inibição de morte celular induzida por coronavírus em células renais de gato (CK).

Ordenada = percentual de células não infectadas após a infecção relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de carragenina na suspensão do vírus (Fig. 5A) ou no meio de pré-incubação (Fig. 5B) em µg/ml; Fig. 5A = células infectadas com o coronavírus felino FIP na presença de iota, capa ou lambda-carragenina, subsequentemente lavadas três vezes com PBS e infectadas com coronavírus felino FIP na ausência do polímero.

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

Ordenada = percentual de células não infectadas após a infecção relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão do vírus (Fig. 6A) ou no meio de pré-incubação (Fig. 6B) em µg/ml; Fig. 6A = células infectadas com o rinovírus humano tipo 8 (HRV8) na presença de iota-carragenina; Fig. 6B = células pré-incubadas por 3 h com iota-carragenina subsequentemente lavadas três vezes com PBS e infectadas com HVR8 na ausência da iota-carragenina.

Fig. 7 mostra a ligação da iota-carragenina rotulada com FITC

a células HeLa após sucessivas lavagens com PBS.

Ordenada = $\mu\text{g/ml}$ calculado de iota-carragenina (convertidos de unidades de luz fluorescente a $\mu\text{g/ml}$ usando uma curva padrão); abscissa = passos da lavagem das células com PBS; 0 = o sobrenadante contendo iota-carragenina rotulada com FITC foi removido das células; 1 = primeiro passo da lavagem das células com PBS; 2 = segundo passo da lavagem das células com PBS; 3 = terceiro passo da lavagem das células com PBS.

Fig. 8 mostra os resultados de um experimento de inibição de morte celular induzida por RSV em células Vero.

Ordenada = percentual de células não infectadas após a infecção relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão do vírus (barras escuras) ou no meio de pré-incubação (barras claras) em $\mu\text{g/ml}$; barras escuras = células infectadas com RSV na presença de iota-carragenina; barras claras = células pré-incubadas por 3 h com iota-carragenina, subsequentemente lavadas três vezes com PBS e infectadas com RSV na ausência da iota-carragenina.

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

Ordenada = percentual de células não infectadas após infecção e 5 dias de incubação relativo a células não infectadas controle; abscissa = pontos no tempo para adição da iota-carragenina em uma concentração final de 100 $\mu\text{g/ml}$ ao meio de incubação (horas pós infecção).

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

Ordenada = percentual de células não infectadas após infecção e 5 dias de incubação relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão do vírus em $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 11 mostra os resultados de um experimento de inibição de morte celular induzida por RSV em células HEp-2.

Ordenada = percentual de células não infectadas após infecção e 6 dias de incubação a 37°C relativo a células não infectadas controle;
5 abscissa = diferentes concentrações finais de iota, capa ou lambda-carragenina na suspensão do vírus em µg/ml.

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

Ordenada = percentual de células não infectadas após infecção
10 relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina (barras escuras) e fucoidan (barras claras) na suspensão do vírus em µg/ml.

Fig. 13 mostra os resultados de um experimento de inibição de morte celular induzida pelo vírus da parainfluenza 3 em células HNep.

15 Ordenada = percentual de células não infectadas após infecção relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de iota, capa ou lambda-carragenina ou fucoidan na suspensão do vírus em µg/ml.

Fig. 14 mostra os resultados de um experimento de inibição de
20 morte celular induzida pelo vírus da influenza H3N2 (FLU) em células HNep.

Ordenada = percentual de células não infectadas após infecção relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de iota, capa ou lambda-carragenina ou fucoidan na suspensão do vírus em µg/ml.

25 Fig. 15 mostra a eficácia da iota, capa, ou lambda-carragenina e fucoidan em reduzir a formação de placas do vírus da influenza A H5N1 em células MDCK em diferentes doses indo a uma concentração final de 400 µg/ml a 44 µg/ml.

Ordenada = percentual de formação de placa após a infecção

das células MDCK com a suspensão do vírus da influenza aviária A H5N1 contendo diferentes concentrações de iota, capa, lambda-carragenina ou fucoïdan relativa à formação de placa de células MDCK infectadas com a suspensão do vírus da influenza H5N1 sem o polímero (ajustado a 100 %);
 5 abscissa = diferentes concentrações finais de iota, capa, lambda-carragenina ou fucoïdan na suspensão do vírus em µg/ml.

Fig. 16 mostra os resultados de um experimento de inibição de morte celular induzida pelo adenovírus tipo 50 (Ad50) em células HNep.

Ordenada = percentual de células não infectadas após infecção
 10 relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão do vírus em µg/ml.

Fig.17 mostra os resultados de um experimento de inibição de morte celular induzida pelo Ad50 em células HNep.

Ordenada = percentual de células não infectadas após a
 15 infecção relativo a células não infectadas controle; abscissa = diferentes concentrações finais de iota-carragenina na suspensão do vírus (barras escuras) ou no meio de pré-incubação (barras claras) em µg/ml; barras escuras = células infectadas com Ad50 na presença de iota-carragenina; barras claras = células pré-incubadas por 3 h com iota-carragenina, subsequente-
 20 lavadas três vezes com PBS e infectadas com Ad50 na ausência da iota-carragenina.

A fim de que a invenção descrita aqui possa ser mais completamente entendida, os seguintes exemplos são apresentados. Os exemplos são para propósitos ilustrativos apenas e não devem ser
 25 interpretados como limitantes a esta invenção, de nenhuma maneira. É ainda entendido que a presente invenção deve também conter variações das expressamente reveladas modalidades até um ponto que seria contemplado por um perito ordinário.

EXEMPLOS

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

Suspensões do vírus contendo 60-80 pfu do vírus da influenza A/Chile/1/93 H1N1 foram misturadas a uma solução de estoque de iota-carragenina até concentrações finais de 0,1, 1, 10, 25, 50 ou 100 µg/ml. Monocamadas confluentes de células renais caninas da linha MDCK em seis placas foram infectados com as suspensões do vírus por 60 min a 34 °C. O inóculo da infecção foi removido e as células foram lavadas com PBS e sobreposição de agarose contendo 0,6 % de agarose foi adicionada. As placas foram incubadas a 36°C em uma atmosfera umidificada de 5 % de CO₂ em ar. 48-60 h após a infecção a sobreposição de agarose foi removida, as células foram coradas com corante violeta cristal e placas visíveis foram contadas. O percentual de formação de placa relativo ao controle infectado (sem tratamento com iota-carragenina) foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 1, foi descoberto que a iota-carragenina inibe, de uma maneira dependente da dose, a formação de placa do vírus da influenza A/Chile/1/93 H1N1 em células MDCK. Uma redução de 50 % em número de placas (IC₅₀) foi alcançada a uma concentração de iota-carragenina de 50 µg/ml.

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

Suspensões do vírus contendo 60-80 pfu do vírus da influenza A/Aichi2/68 H3N2 foram misturadas a uma solução de estoque de iota-carragenina até concentrações finais de 75, 150 ou 300 µg/ml. Monocamadas confluentes de células renais caninas da linha MDCK em seis placas foram infectados com as suspensões do vírus por 60 min a 34 °C. O inóculo da infecção foi removido e as células foram lavadas com PBS e sobreposição de agarose contendo 0,6 % de agarose foi adicionada. As placas foram incubadas

a 37°C em uma atmosfera umidificada de 5 % de CO₂ em ar. 48-60 h após a infecção a sobreposição de agarose foi removida, as células foram coradas com corante violeta cristal e placas visíveis foram contadas. O percentual de formação de placa relativo ao controle infectado (sem tratamento com iota-carragenina) foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 2, foi descoberto que a iota-carragenina inibe, de uma maneira dependente da dose, a formação de placa do vírus da influenza A/Aichi2/68 H3N2 em células MDCK.

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

Suspensões do vírus contendo 60-80 pfu do vírus da parainfluenza 3 foram misturadas a uma solução de estoque de iota-carragenina até concentrações finais de 0,1, 1, 10, 25, 50 ou 100 µg/ml. A mistura foi incubada por 1 h a 34 °C. Monocamadas confluentes de células Hep-2 em seis placas foram infectados com as suspensões do vírus por 60 min a 34 °C. O inóculo da infecção foi removido e as células foram lavadas com PBS e sobreposição de agarose contendo 0,6 % de agarose foi adicionada. As bandejas uma atmosfera umidificada a 5 % de CO₂. 48-60 h após a infecção a sobreposição de agarose foi removida, as células foram coradas com corante violeta cristal e placas visíveis foram contadas. O percentual de formação de placa relativo ao controle infectado (sem iota-carragenina) foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 3, foi descoberto que a iota-carragenina inibe, de uma maneira dependente da dose, a formação de placa do vírus da parainfluenza 3 em células Hep-2. Uma redução de 50 % em número de placas (IC₅₀) foi alcançada a uma concentração de iota-carragenina de 10 µg/ml.

Exemplo 4: Efeito da pré-incubação com iota-carragenina na

formação de placas do vírus da parainfluenza 3 em células HeLa.

Monocamadas confluentes de células HeLa foram incubadas três horas com iota-carragenina a uma concentração de 13, 40, 133 e 400 µg/ml. O sobrenadante contendo iota-carragenina foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS e daí em diante infectadas com o vírus da parainfluenza 3 como descrito no Exemplo 3, mas sem adição de iota-carragenina à suspensão do vírus. O percentual de formação de placas relativo ao controle infectado (sem pré-tratamento com iota-carragenina) foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 4, foi descoberto que a iota-carragenina inibe a formação de placas do vírus da parainfluenza 3 a uma concentração de 400 e 133 µg/ml quando as células foram pré-incubadas por três horas com iota-carragenina, embora não houvesse iota-carragenina presente no momento da infecção e durante toda o subsequente período de incubação a 37 °C. Este resultado indica que a iota-carragenina modifica quimicamente ou estruturalmente os receptores da superfície da célula hospedeira de uma forma tal que a ligação receptor-mediada do vírus da parainfluenza 3 à célula hospedeira seja impedido ou prevenido mesmo na ausência do agente modificante carragenina. Isto é também prova de uma forte eficácia profilática da iota-carragenina.

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

Células CK subconfluentes foram infectadas na presença de iota, capa, ou lambda-carragenina a uma concentração de 4, 40 e 400 µg/ml com o coronavírus felino FIPV a um moi (multiplicidade de infecção) de 0,1 (vide Fig. 5A). Em comparação, células CK subconfluentes foram incubadas três horas com iota, lambda ou capa-carragenina a uma concentração de 4, 40, e 400 µg/ml. O sobrenadante contendo carragenina foi removido e as células

foram lavadas três vezes com PBS e infectadas com o coronavírus FIP ($\text{moi} = 0,1$) na ausência do polímero (vide Fig. 5B). O percentual de células viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada carragenina e cada concentração.

5 Como mostrado na Figura 5A, todos os três tipos de carragenina inibem a morte celular mediada pelo coronavírus em células CK na mais alta concentração de 400 $\mu\text{g/ml}$. A iota-carragenina ainda demonstra significativa inibição a uma concentração de 4 $\mu\text{g/ml}$ enquanto que a capa e lambda-carragenina não são efetivas nesta concentração. Da Figura 5B pode-se concluir que em contraste a vírus que entram na célula via receptores açúcar (vide exemplos precedentes), a infecção por coronavírus não parece ser inibida devido à modificação química ou estrutural do receptor coronavírus-específico na superfície da célula hospedeira pela carragenina, já que não foi possível aumentar a proteção à célula hospedeira além de um
10 nível de 35 % de inibição mesmo na mais alta concentração experimental de carragenina de 400 $\mu\text{g/ml}$ e em um período de pré-incubação de três horas. Nem o pré-tratamento das células hospedeiras com carragenina melhorou significativamente a proteção celular contra a infecção por coronavírus. Os
15 resultados sugerem que a fim de se alcançar uma proteção significativa contra a infecção pelo coronavírus o agente antiviral ativo, i.e. carragenina, deve estar presente no momento da infecção, i.e. quando uma interação entre o vírus e a célula hospedeira estiver a ponto de ocorrer.

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

25 Células HeLa subconfluentes foram infectadas com o rinovírus humano tipo 8 (HRV8; $\text{moi} = 0,1$) na presença de iota-carragenina a uma concentração de 4, 40 e 400 $\mu\text{g/ml}$ (vide Fig. 6A). Em comparação, células HeLa subconfluentes foram incubadas por três horas com iota-carragenina a uma concentração de 4, 40, e 400 $\mu\text{g/ml}$ antes da infecção. O

sobrenadante contendo iota-carragenina foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS e então infectadas com o HRV8 na ausência do polímero (vide Fig. 6B). O percentual de células viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

5 Como mostrado na Figura 6A, a iota-carragenina inibe a morte celular mediada pelo HRV8 em todas as concentrações. Da Figura 6B pode-se concluir que em contraste a vírus que entram na célula via receptores açúcar, a morte celular mediada por HRV8 não foi inibida por mais de 5 % mesmo a 400 µg/ml e onde as células foram pré-incubadas por três horas com iota-
10 carragenina. Este resultado é consistente com descobertas prévias (dados não mostrados) e sugere que para o HRV8 a pré-incubação das células alvo com carragenina não protege significativamente as células alvo de serem infectadas se a carragenina estiver faltando no momento da infecção. Este resultado indica que o receptor para o HRV8, o receptor de LDL, não é modificado ou
15 mascarado pelo tratamento com a iota-carragenina.

Exemplo 7: A iota-carragenina é quantitativamente removida de células HeLa pela lavagem das células com PBS

Células HeLa foram incubadas com iota-carragenina rotulada com FITC a uma concentração de 400, 133, 4 e 0,4 µg/ml por 10 minutos,
20 então o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS. A quantidade de carragenina rotulada com FITC residual foi determinada com um leitor para detecção de fluorescência (BMG-Omega) após a remoção do sobrenadante contendo iota-carragenina rotulada com FITC e após cada passo da lavagem. As unidades de luz fluorescente foram
25 convertidas a valores de concentração de µg/ml de carragenina pelo uso de uma curva padrão.

Como mostrado na Figura 7 a iota-carragenina rotulada com FITC foi quantitativamente removida (> 95 %) das células HeLa pela lavagem das células ao menos três vezes com PBS. O resultado prova que a

carragenina não se liga covalentemente à superfície das células. O resultado foi confirmado por um segundo conjunto experimental, onde o período de incubação foi estendido de 10 minutos a 3 horas usando o mesmo método de detecção. Os resultados assim suportam as conclusões obtidas aqui e nos
5 exemplos de interesse de que a carragenina induz uma modificação dos receptores açúcar na superfície da célula alvo envolvida na ligação com os vírions, cuja modificação ainda está presente após remoção do polímero da superfície da célula alvo.

Exemplo 8: Efeito de pré-tratamento de células eucarióticas
10 pela iota-carragenina na inibição de morte celular mediada por RSV

Células Vero subconfluentes foram infectadas na presença de iota-carragenina em concentrações de 0,4, 4 e 40 $\mu\text{g/ml}$ com RSV ($\text{moi} = 0,1$). Em comparação, células Vero subconfluentes foram incubadas por três horas com iota-carragenina a uma concentração de 0,4, 4 e 40 $\mu\text{g/ml}$. O
15 sobrenadante contendo iota-carragenina foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS e infectadas com o RSV ($\text{moi} = 0,1$) na ausência da carragenina. O percentual de células viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada concentração de carragenina.

Como mostrado na Figura 8, a iota-carragenina inibe a morte
20 celular mediada pelo RSV em todas as concentrações mesmo se o polímero estiver ausente no momento ou durante a infecção. Sabe-se que RSV adere às células via sulfato de heparana, uma molécula de açúcar que está presente na superfície de células epiteliais. Os resultados indicam que este receptor é modificado pela iota-carragenina e a adesão do RSV à superfície da célula e a
25 subsequente replicação viral é desse modo bloqueada.

Exemplo 9: Efeito do tratamento de células eucarióticas com iota-carragenina em diferentes pontos no tempo após infecção na inibição de morte celular mediada pelo RSV em células HNep

Células HNep subconfluentes foram infectadas com RSV (moi

= 0,1). A iota-carragenina foi adicionada a uma concentração final de 40 $\mu\text{g/ml}$ em diferentes pontos no tempo pós infecção como indicado na Fig. 9 (0, 8, 24, 32, 48, 56 e 72 h pós infecção) e o percentual de células HNep viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada ponto no tempo.

Como mostrado na Figura 9, a iota-carragenina significativamente inibe a morte celular mediada pelo RSV a uma concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ mesmo quando o polímero fora adicionado apenas 24 horas após a infecção. Este resultado demonstra que a iota-carragenina não pode ser apenas usada profilaticamente mas pode também exercer eficácia antiviral no curso de um tratamento terapêutico quando aplicada na fase inicial da infecção viral.

Exemplo 10: Efeito do tratamento profilático com iota-carragenina na inibição de morte celular mediada pelo RSV em células HNep

Células HNep subconfluentes foram infectadas na presença de iota-carragenina em concentrações de 400, 133, 44, 15, 5, 2 e 1 $\mu\text{g/ml}$ com RSV ($\text{moi} = 0,1$). O percentual de células viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 10, a iota-carragenina significativamente inibe a morte celular mediada pelo RSV mesmo a uma concentração tão baixa quanto 1 $\mu\text{g/ml}$ quando o polímero estava presente durante a infecção. Este resultado demonstra que a iota-carragenina pode ser usada efetivamente para estratégias de intervenção profilática.

Exemplo 11: Efeito de tratamento de células eucarióticas por diferentes carrageninas na inibição de morte celular mediada pelo RSV em células HEp-2

Células HEp-2 em 6 placas foram infectadas na presença de iota, capa ou lambda-carragenina a uma concentração de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 $\mu\text{g/ml}$ com o vírus RSV A2 ($\text{moi} = 0,001$). O percentual de células viáveis

relativo ao controle não infectado foi determinado para cada carragenina e cada concentração.

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

Exemplo 12: Comparação do efeito do tratamento de células eucarióticas por iota-carragenina e fucoïdan na inibição de morte celular mediada pelo RSV

Células HNep subconfluentes foram infectadas na presença de iota-carragenina e fucoïdan em concentrações de 400, 133, 44, 15, 4, 1,3 e 0,4 µg/ml com RSV (moi = 0,1). O percentual de células HNep viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada concentração de iota-carragenina e cada concentração de fucoïdan.

Como mostrado na Figura 12, o fucoïdan significativamente inibe a morte celular mediada pelo RSV em células HNep a uma concentração de 0,4 µg/ml quando o polímero está presente durante a infecção. O fucoïdan é portanto um candidato interessante para o desenvolvimento de produtos para a profilaxia e tratamento de infecções por RSV.

Exemplo 13: Efeito de tratamento de células eucarióticas com diferentes carrageninas e fucoïdan na inibição de morte celular mediada pelo vírus da parainfluenza 3

Células HNep subconfluentes foram infectadas na presença de tanto iota quanto capa e lambda-carragenina ou fucoïdan em concentrações de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 e 0,4 µg/ml com o vírus da parainfluenza tipo 3. O percentual de células HNep viáveis (portanto não infectadas) relativo ao controle não infectado foi determinado para cada polímero e cada concentração de polímero.

Como mostrado na Figura 13, todos os três tipos de carragenina inibem a morte celular mediada pelo vírus da parainfluenza 3 em

células HNep com a iota-carragenina mostrando o efeito mais forte. O fucoidan também inibe a morte celular mediada pelo vírus da parainfluenza 3 em células HNep até certo ponto comparável com o efeito inibitório da capa e lambda-carragenina.

5 Exemplo 14: Efeito de tratamento de células eucarióticas com diferentes carrageninas e fucoidan na inibição de morte celular mediada pelo vírus H3N2

10 Células HNep subconfluentes foram infectadas na presença de iota, capa, lambda-carragenina e fucoidan em concentrações de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 e 0,4 µg/ml com o vírus da influenza H3N2. O percentual de células HNep viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada polímero e cada concentração de polímero.

15 Como mostrado na Figura 14, todos os três tipos de carragenina inibem a morte celular mediada pelo vírus da influenza H3N2 em células HNep. Em adição, foi descoberto que o fucoidan inibe a morte celular mediada pelo vírus da influenza H3N2 em células HNep até certo ponto comparável ao da iota-carragenina.

 Exemplo 15: Efeito de diferentes carrageninas e fucoidan na formação de placas do vírus da influenza aviária H5N1 em células MDCK

20 Suspensões do vírus contendo 60-80 pfu do vírus da influenza aviária H5N1 foram misturadas a uma solução de polímero de estoque de tanto iota, quanto capa, lambda-carragenina ou fucoidan até concentrações finais de polímero de 400, ou 44,4 µg/ml. Monocamadas confluentes de células renais caninas da linha MDCK em seis placas foram infectados com as
25 suspensões do vírus por 60 min a 34 °C. O inóculo da infecção foi removido e as células foram lavadas com PBS e sobreposição de agarose contendo 0,6 % de agarose foi adicionada. As placas foram incubadas a 36°C em uma atmosfera umidificada de 5 % de CO₂ em ar. 48-60 h após a infecção a sobreposição de agarose foi removida, as células foram coradas com corante

violeta cristal e placas visíveis foram contadas. O percentual de formação de placa relativo ao controle infectado (sem tratamento com o polímero) foi determinado para cada polímero e cada concentração de polímero.

5 Como mostrado na Figura 15, foi descoberto que a formação de placas do vírus da influenza aviária H5N1 não foi influenciada pela iota e lambda-carragenina e fucoidan. Contudo, a capa-carragenina inibe, de uma maneira dependente da dose, a formação de placas do vírus da influenza aviária H5N1 em células MDCK. Já que o vírus da influenza aviária preferencialmente se liga a resíduos de ácido siálico com ligação alfa 2-3 os
10 resultados indicam que a capa-carragenina pode preferencialmente modificar tais resíduos de ácido siálico tendo ligação 2-3.

Exemplo 16: Efeito do tratamento profilático em células eucarióticas com iota-carragenina na inibição de morte celular mediada pelo adenovírus tipo B (Ad50)

15 Células HNep subconfluentes foram infectadas na presença de iota-carragenina em concentrações de 400, 133,3, 44,4, 14,8, 4, 1,3 e 0,4 µg/ml com o Ad50. O percentual de células HNep viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

20 Como mostrado na Figura 16, a iota-carragenina significativamente inibe a morte celular mediada pelo Ad50 mesmo a uma concentração tão baixa quanto 4 µg/ml quando o polímero está presente no momento e durante a infecção. Este resultado é uma indicação de que a iota-carragenina pode ser usada para efetivas estratégias de intervenção profilática contra o adenovírus do subtipo B (por exemplo Ad50). Contudo, quando
25 outros adenovírus dos subtipos A, C e D foram testados em um conjunto experimental como o descrito acima não foi detectado nenhum efeito significativo da iota-carragenina (dados não mostrados).

Exemplo 17: Comparação do efeito do tratamento profilático de células eucarióticas com iota-carragenina na inibição de morte celular

mediada pelo Ad50

Células HNep subconfluentes foram infectadas na presença de iota-carragenina em concentrações de 400, 40 e 4 $\mu\text{g/ml}$ com Ad50. Em comparação, células HNep subconfluentes foram incubadas por três horas com iota-carragenina a uma concentração de 400, 40 e 4 $\mu\text{g/ml}$ antes da infecção. O sobrenadante contendo iota-carragenina foi removido e as células foram lavadas três vezes com PBS e infectadas com o Ad50 na ausência da carragenina. O percentual de células HNep viáveis relativo ao controle não infectado foi determinado para cada concentração de iota-carragenina.

Como mostrado na Figura 17, a iota-carragenina significativamente inibe a morte celular mediada pelo Ad50 a uma concentração de 400 e 40 $\mu\text{g/ml}$ na presença e na ausência da iota-carragenina no momento da infecção e durante o período de infecção observado. Estes dados indicam que a iota-carragenina modifica o receptor da superfície da célula para adenovírus do subtipo B, o qual se sabe ser um receptor açúcar, enquanto que os adenovírus de outros subtipos provavelmente entram na célula via diferentes receptores.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de iota-carragenina em uma quantidade antiviral eficaz, caracterizado pelo fato de ser na manufatura de uma composição farmacêutica ou medicamento para o tratamento profilático ou terapêutico de um sintoma, condição ou doença causada por ou associada a uma infecção por um vírus respiratório selecionado do grupo consistindo de paramixovírus, vírus da influenza A humana e adenovírus do subtipo B.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o vírus respiratório é um vírus que entra em uma célula hospedeira via adesão à célula mediada por receptor, o receptor compreendendo um ou mais resíduos de açúcar, preferencialmente resíduos de ácido siálico ou sulfato de heparano.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito vírus respiratório é um paramixovírus.

4. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito vírus respiratório é um vírus da influenza A humana.

5. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o dito vírus se liga à célula hospedeira via um receptor de superfície da célula que inclui resíduos de ácido siálico tendo ligações alfa 2-6.

6. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito vírus respiratório é um adenovírus do subtipo B.

7. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o dito paramixovírus é selecionado do grupo consistindo do vírus da parainfluenza humana (HPV) tipo 1, HPV tipo 2, HPV tipo 3, HPV tipo 4 e RSV.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o dito paramixovírus é RSV.

9. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado

pelo fato de que a dita doença ou condição patológica é selecionada do grupo consistindo de bronquite aguda, bronquite crônica, rinite, sinusite, laringotraquiobronquite, bronquiolite aguda, faringite, amigdalite, laringite, traqueíte, asma e pneumonia.

5 10. Uso de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito sintoma é selecionado do grupo consistindo de febre, dor, tontura, tremores, sudorese e desidratação.

10 11. Uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica antiviral ou medicamento é adaptado para uso tópico na pele ou uso nas mucosas e é preferencialmente preparado como uma loção para a pele, creme, pomada, gel, pó, incluindo um pó para inalação, spray, espuma, gotas líquidas ou uma solução de gargarejo.

15 12. Uso de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica antiviral ou medicamento é adaptado para administração oral e é preferencialmente preparado como uma solução líquida ou como uma preparação semi-sólida ou sólida tal qual um pó seco, tabletes, cápsulas, ou drágeas.

20 13. Uso de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que a composição é líquida ou semi-sólida e compreende, como uma preparação pronta para uso, iota-carragenina em uma quantidade entre 0,01% e 10%, preferencialmente entre 0,01% e 5%, mais preferencialmente entre 0,1% e 2% em peso, relativo ao volume total da preparação.

25 14. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a composição é sólida e compreende, como uma preparação pronta para uso, iota-carragenina em uma quantidade entre 0,01% e 10%, preferencialmente entre 0,01% e 5%, mais preferencialmente entre 0,1% e 2% em peso.

15. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo

fato de que a composição compreende adicionalmente capa-carragenina.

16. Uso de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a composição inclui 50% ou mais, preferencialmente 70% ou mais, e especialmente 95% ou mais em peso seco de iota-carragenina, relativo
5 ao peso seco total de carrageninas presentes na composição.

17. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizada pelo fato de que a dita composição ainda inclui ao menos um veículo farmacêuticamente aceitável e/ou aditivo.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo
10 fato de que o aditivo farmacêuticamente aceitável compreende um sal de metal alcalino farmacêuticamente aceitável, preferencialmente um cloreto, especialmente cloreto de sódio ou potássio.

19. Uso de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o dito sal farmacêuticamente aceitável está presente na composição em
15 uma quantidade de 1% ou menos, preferencialmente de 0,6% ou menos.

20. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 19, caracterizado pelo fato de que a composição inclui uma parte ou toda a iota-carragenina na forma de seu sal, preferencialmente na forma de um sal sódico.

21. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, caracterizado pelo fato de que a composição é estéril e preferencialmente livre de
20 pirógeno e de alérgeno.

22. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que a composição é aderida tanto por revestimento quanto por impregnação a uma superfície sólida de um item de higiene ou
25 sanitário, particularmente de uma luva de higiene ou sanitária, lenço de papel ou papel, especialmente um lenço de papel ou papel nasal, uma haste flexível com ponta de algodão, máscara anti-poeira ou máscara facial sanitária ou médica.

23. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de a composição é integrada em um batom.

24. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que a composição compreende adicionalmente um composto não carragenina fisiologicamente ativo, dito composto opcionalmente sendo o principal ingrediente ativo.

5 25. Uso de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a iota-carragenina está presente como um aditivo, particularmente como um adjuvante anti-paramixoviral ou anti-ortomixoviral juntamente com uma ou mais substâncias não carragenina fisiologicamente ativas que são tipicamente aplicadas na profilaxia ou terapia de doenças infecciosas e/ou
10 inflamatórias, alergias e/ou condições de um sistema imune em deficiência ou suprimido.

 26. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 25, caracterizado pelo fato de que a doença ou condição patológica está em um indivíduo sendo paciente de alto risco selecionado do grupo consistindo de
15 pacientes COPD, um paciente com asma, uma pessoa com alergias, uma pessoa com sistema imune, cardíaco, ou pulmonar em deficiência e um paciente transplantado.

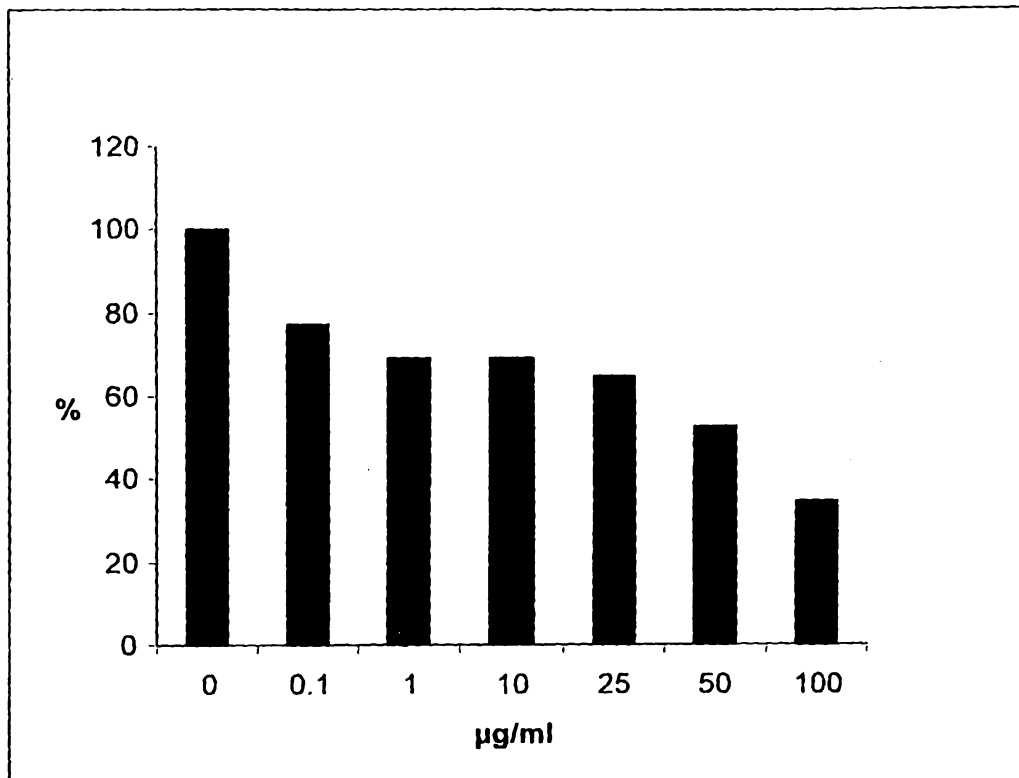


Fig.1

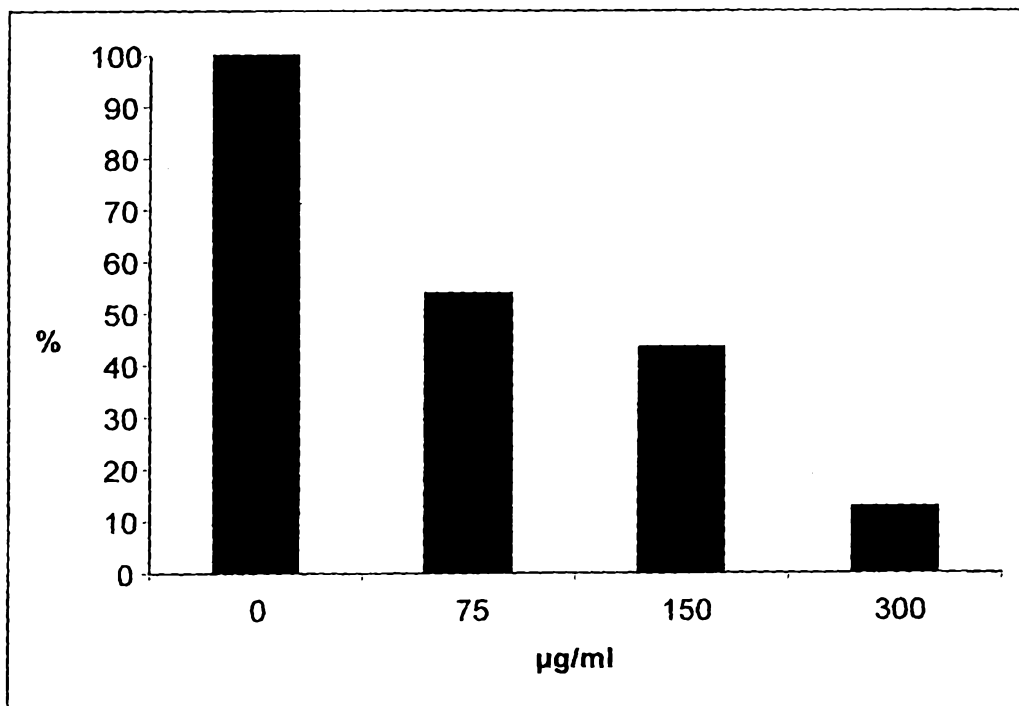
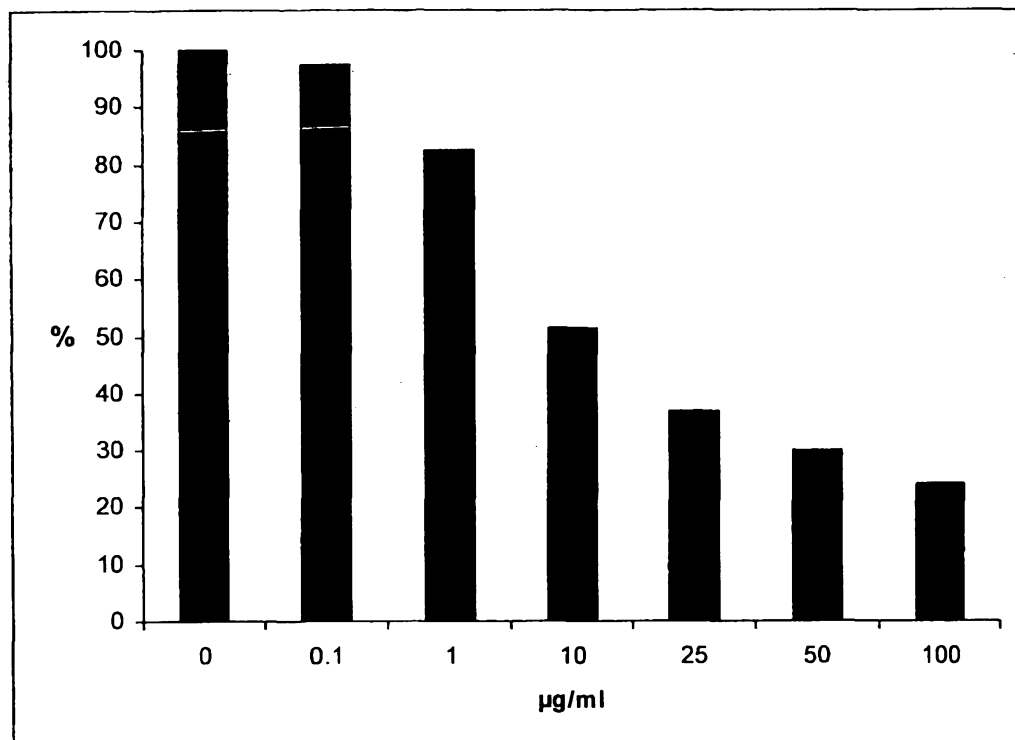
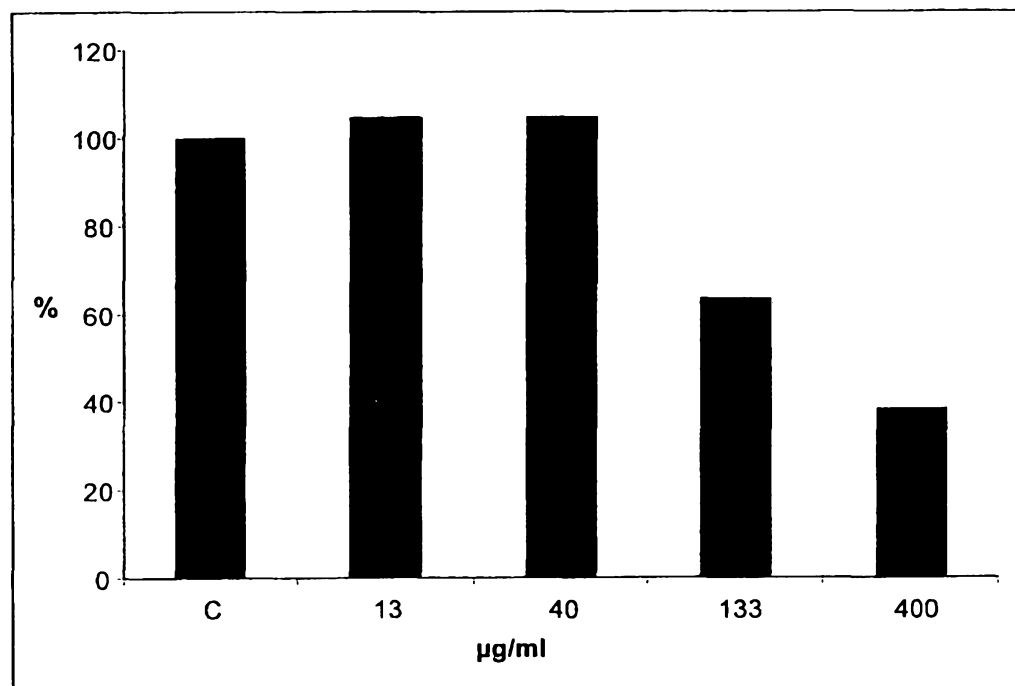


Fig.2

**Fig.3****Fig.4**

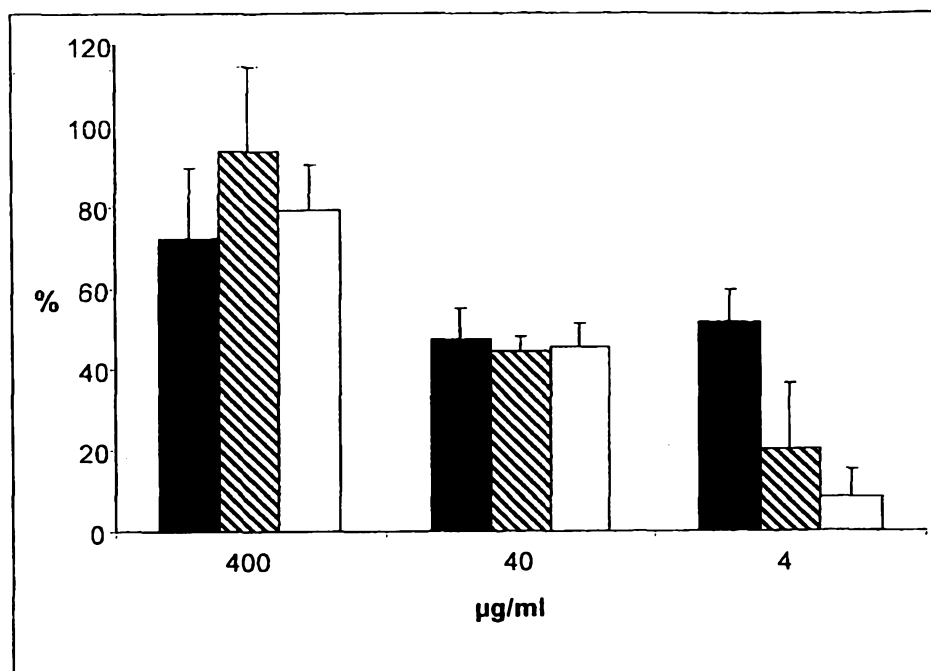


Fig.5A

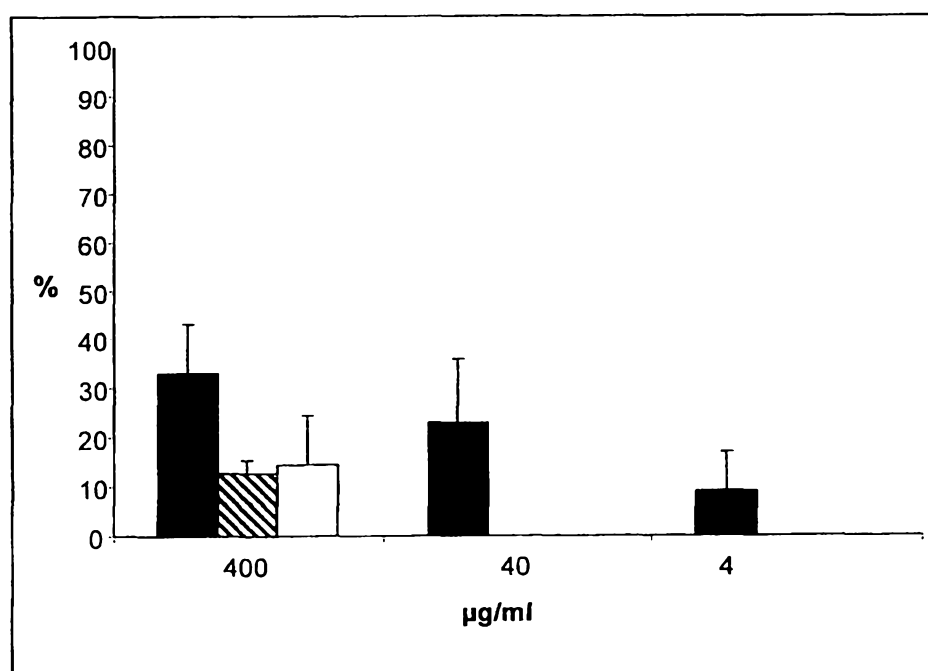


Fig.5B

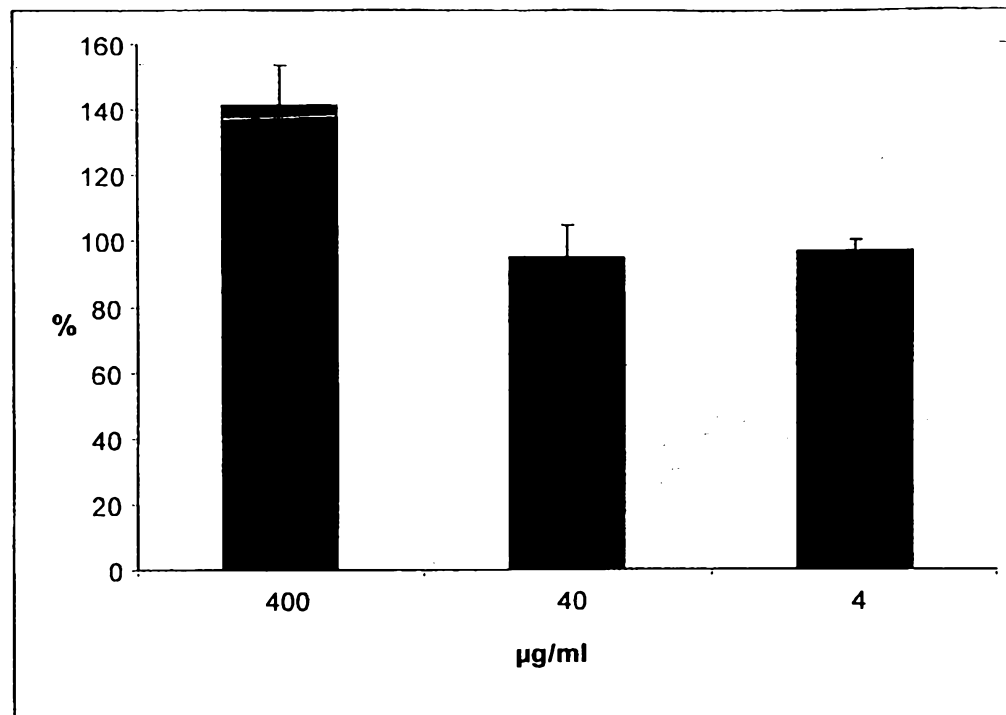


Fig.6A

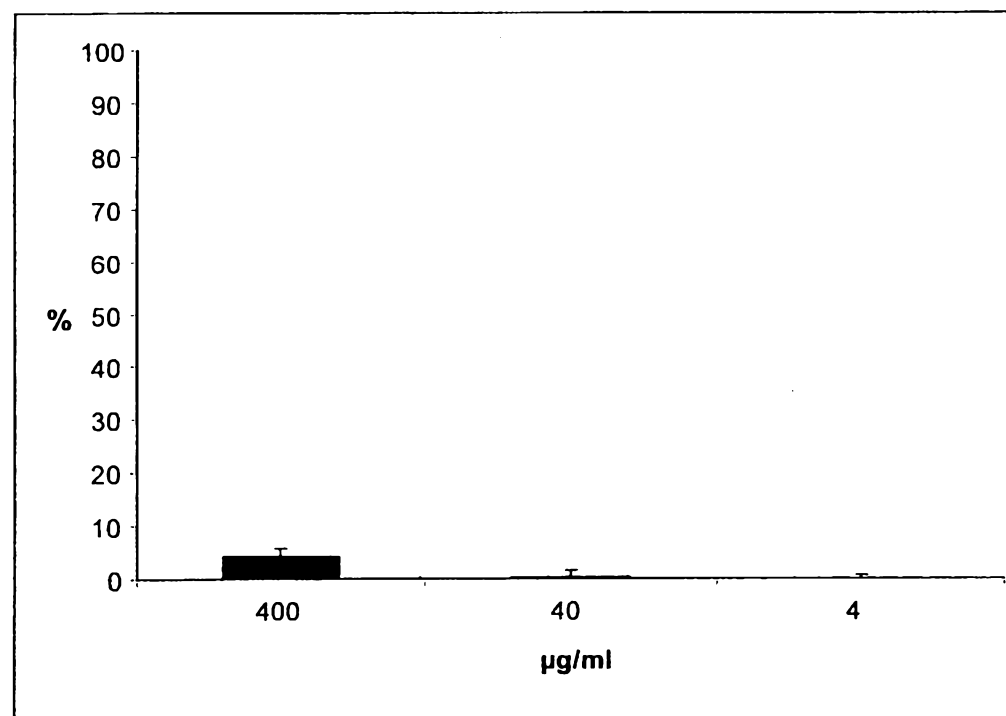


Fig.6B

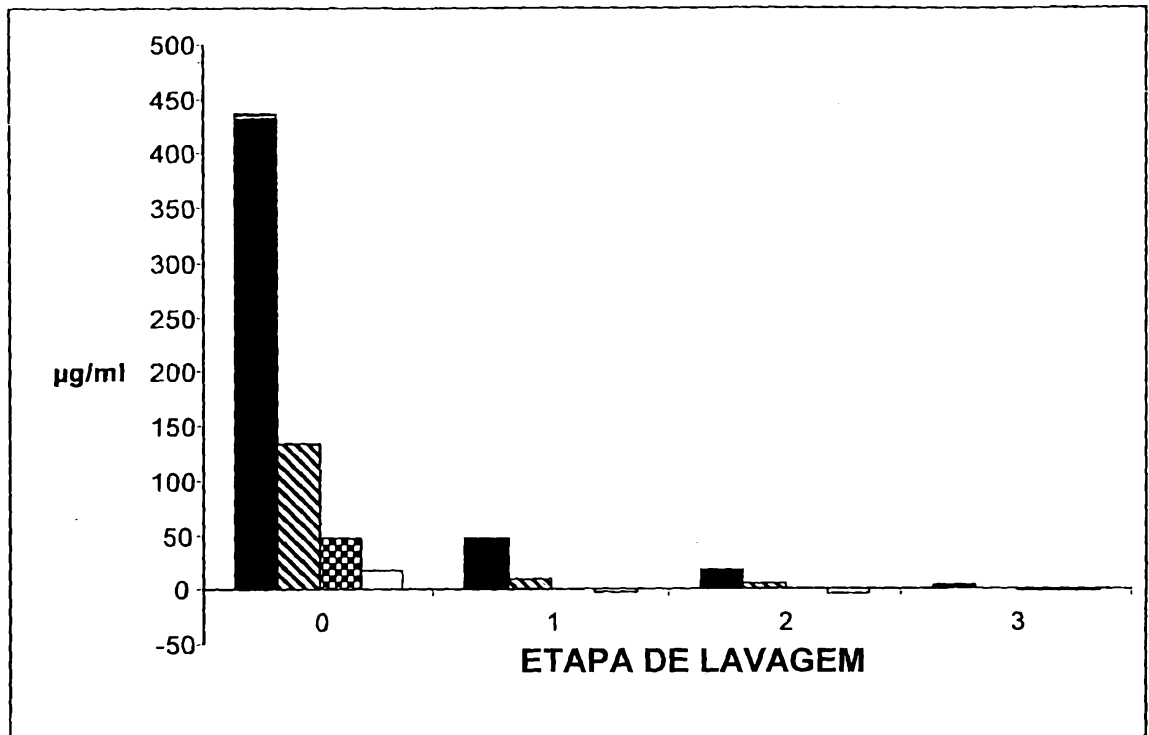


Fig.7

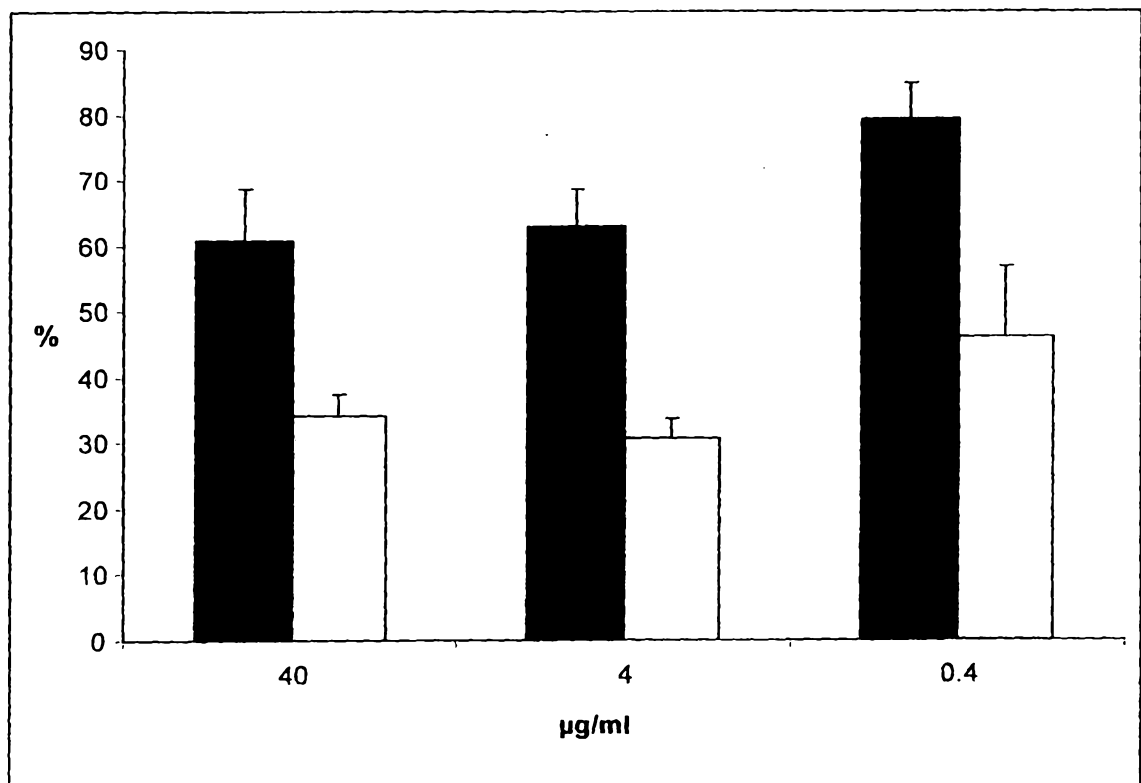


Fig.8

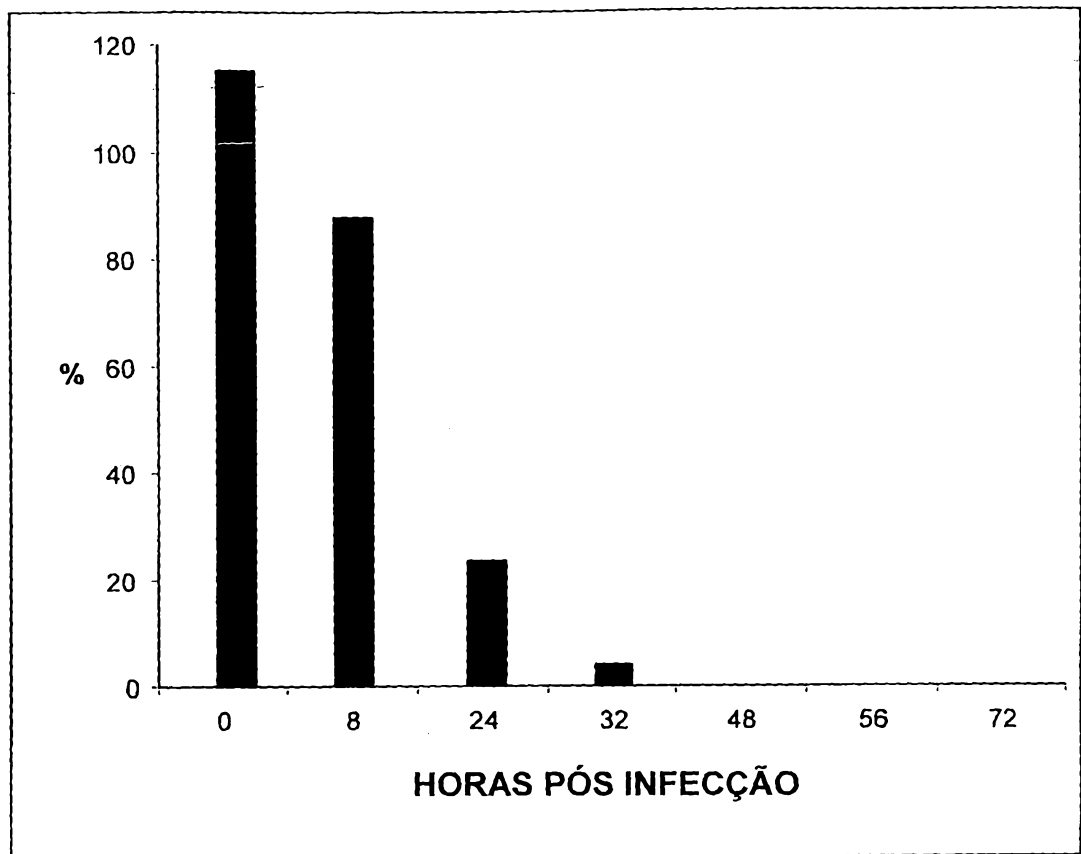


Fig.9

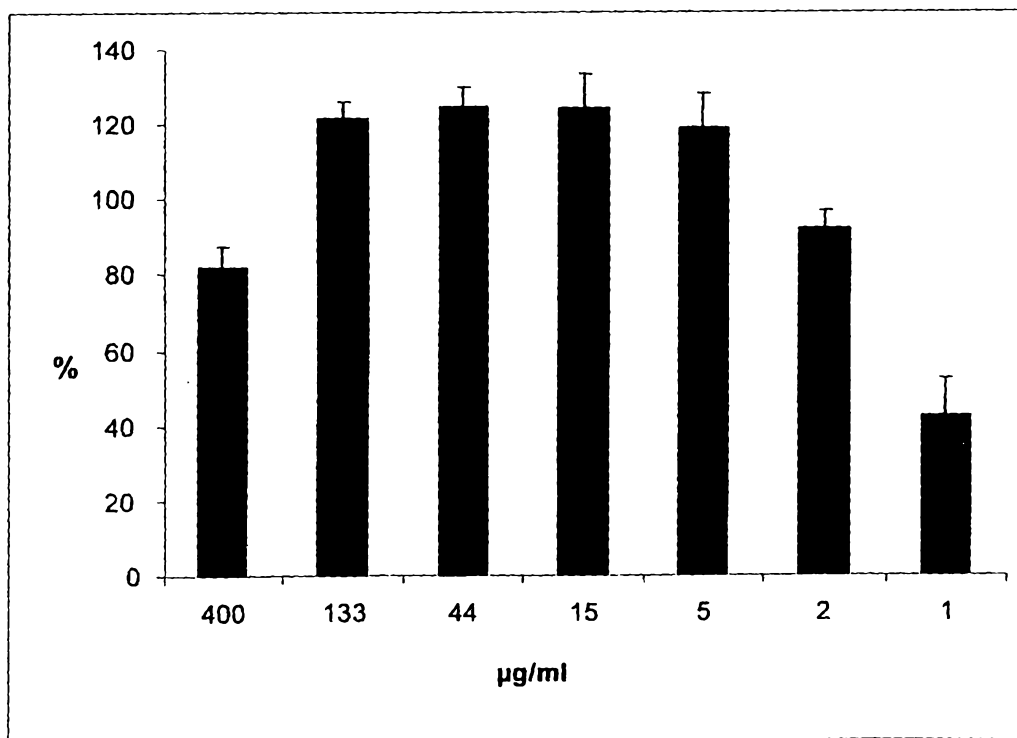


Fig.10

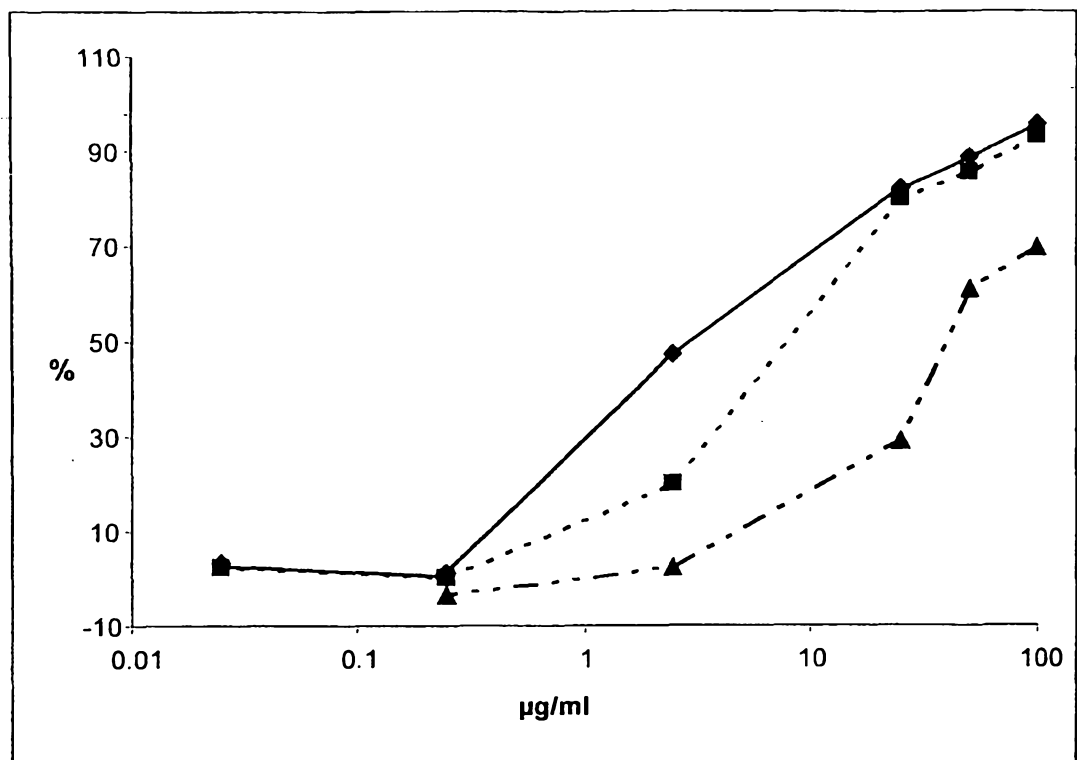


Fig. 11

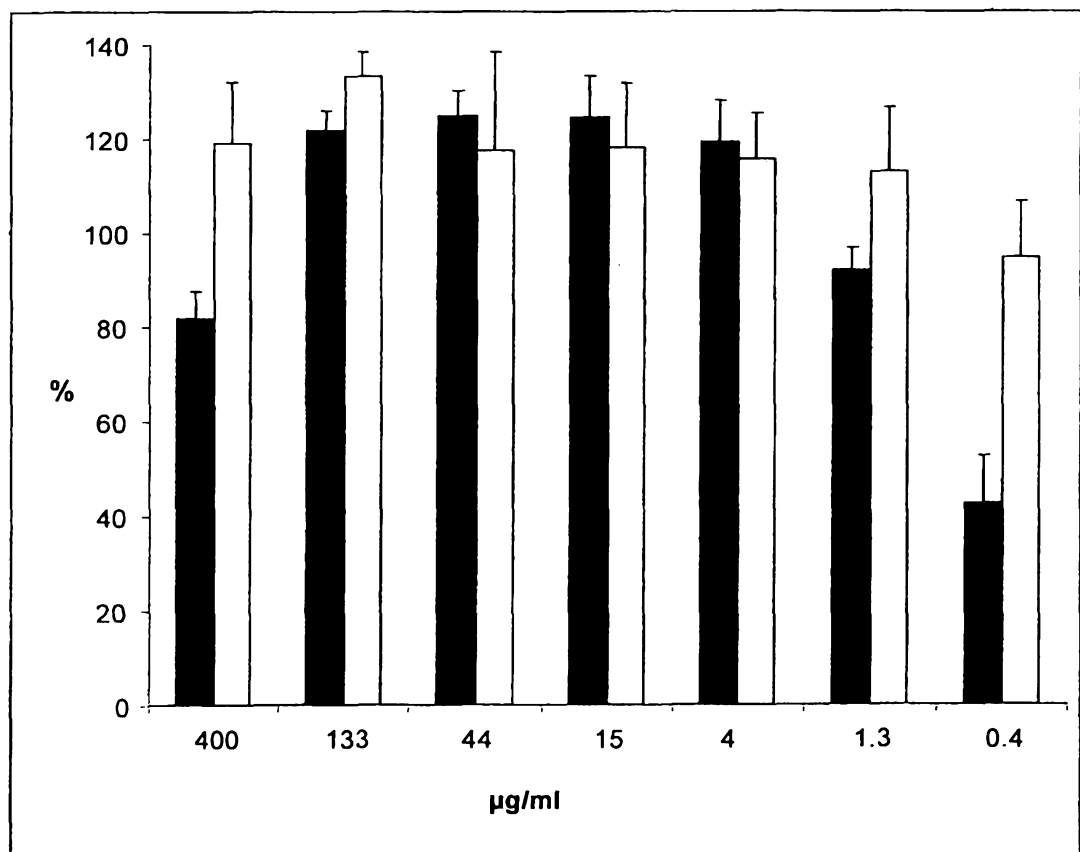


Fig. 12

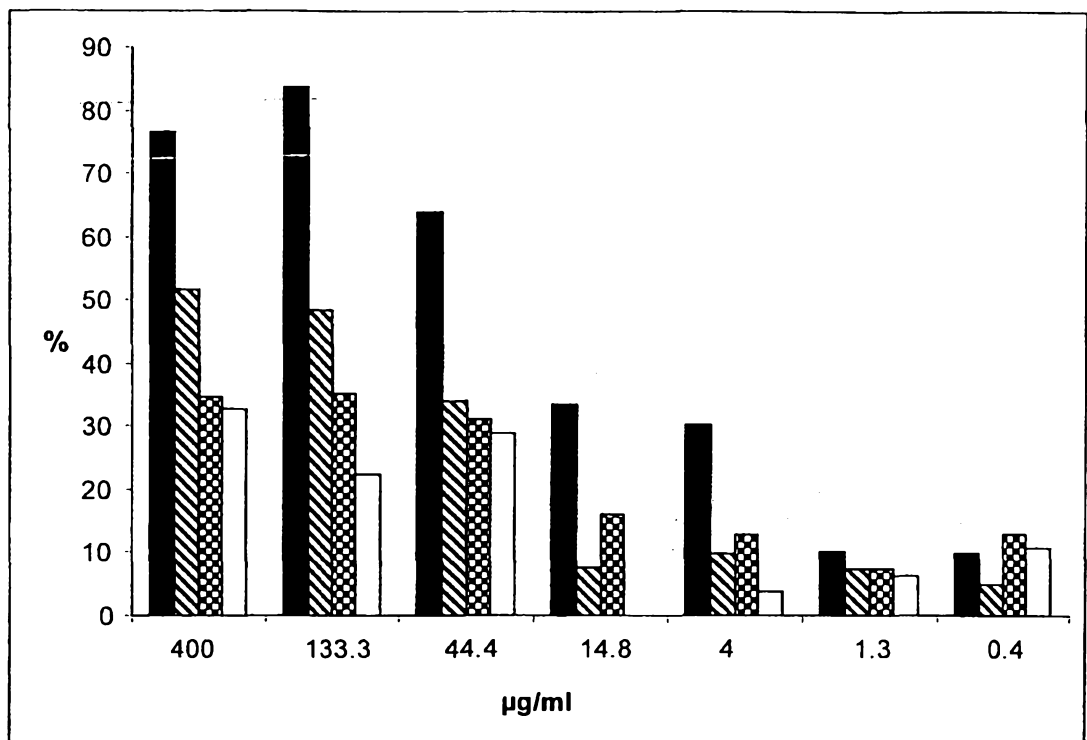


Fig.13

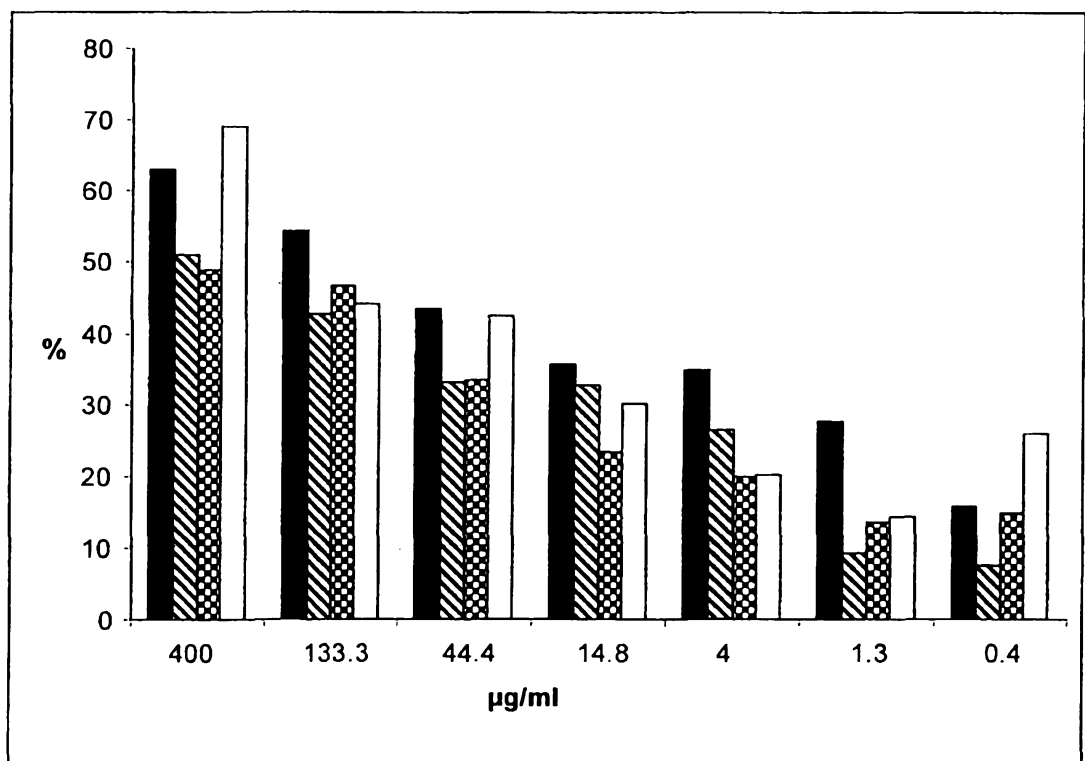


Fig.14

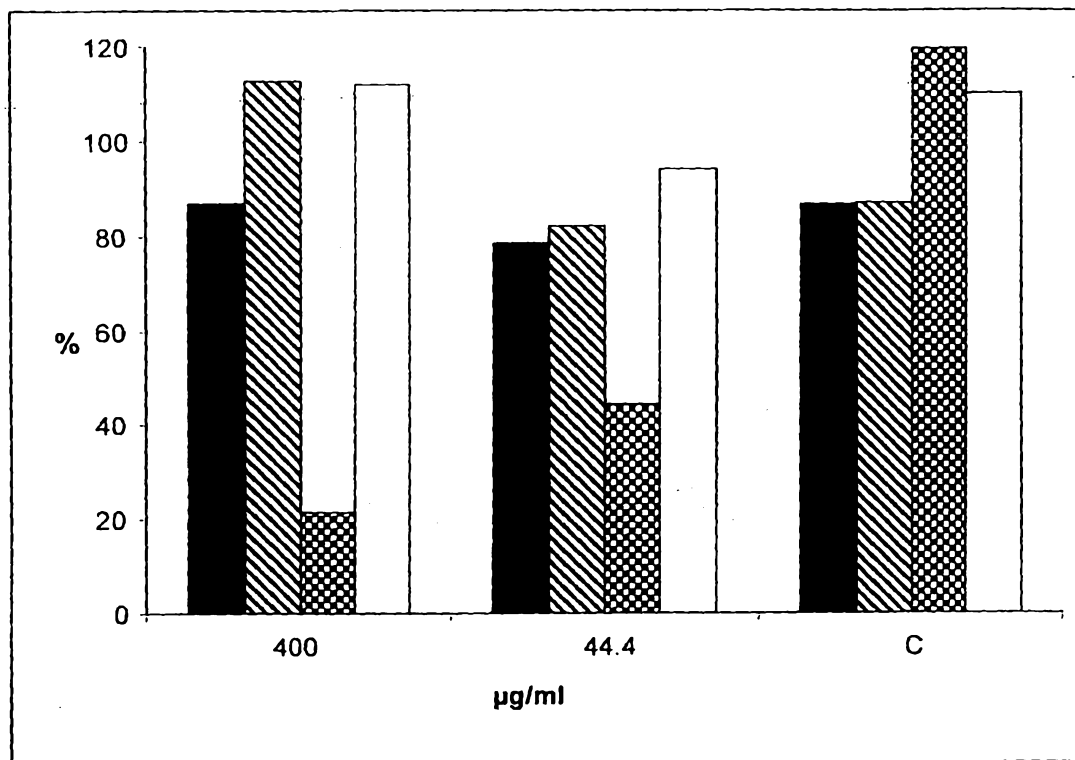


Fig. 15

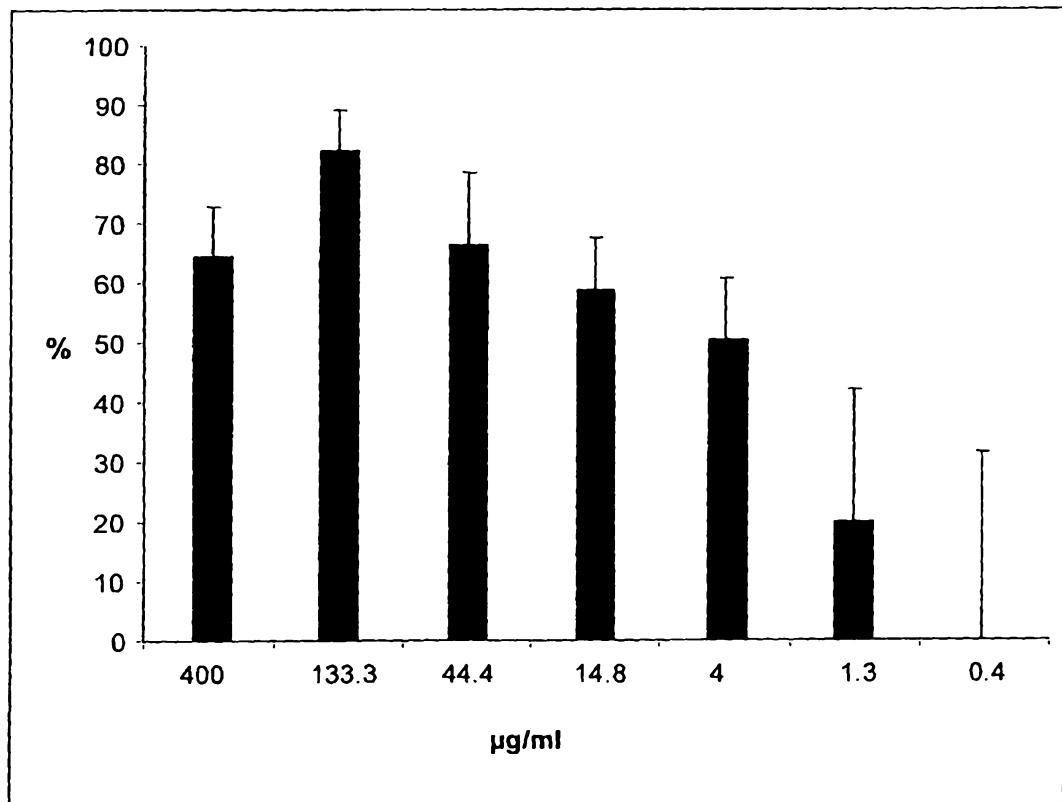


Fig. 16

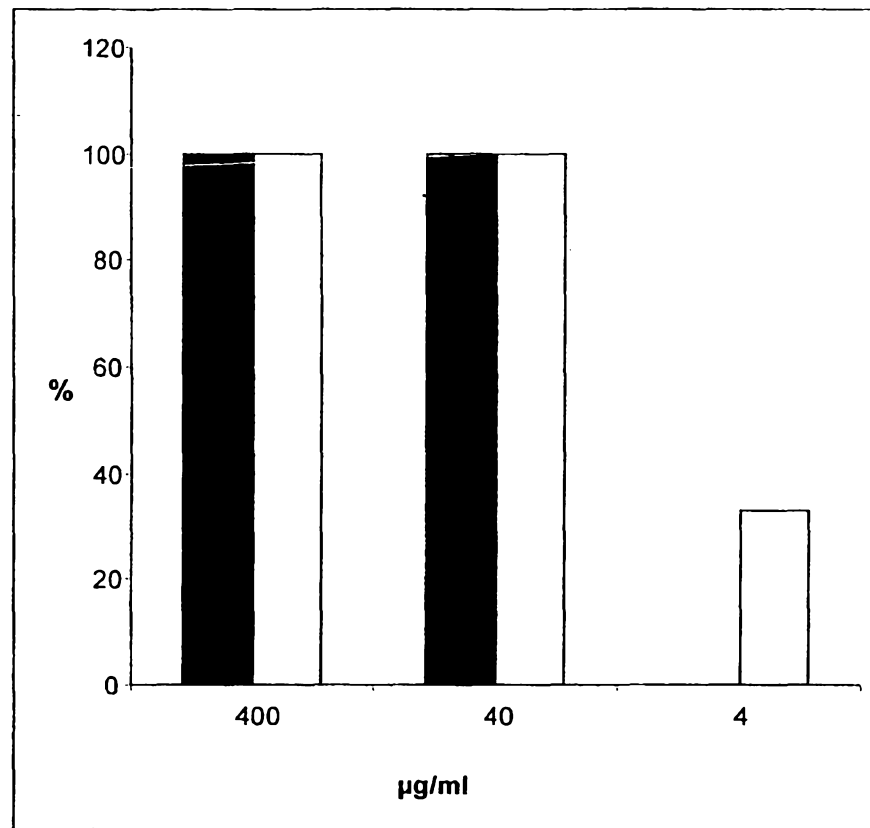


Fig.17