



República Federativa do Brasil
Ministério de Desenvolvimento, Indústria,
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0809007-6 A2



* B R P I 0 8 0 9 0 0 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 12/03/2008
(43) Data da Publicação: 16/09/2014
(RPI 2280)

(51) Int.Cl.:
A61K 31/454
A61K 31/7056

(54) Título: COMPOSIÇÕES E KITS PARA TRATAMENTO DE GRIPE

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 29/02/2008 US 12/040,856, 13/03/2007 US 60/918,011, 05/10/2007 US 60/978,099, 21/11/2007 US 60/989,790, 29/02/2008 US 12/040,856, 13/03/2007 US 60/918,011, 13/03/2007 US 60/918,011, 05/10/2007 US 60/978,099, 29/02/2008 US 12/040,856, 05/10/2007 US 60/978,099, 05/10/2007 US 60/978,099, 21/11/2007 US 60/989,790, 21/11/2007 US 60/989,790, 29/02/2008 US 12/040,856

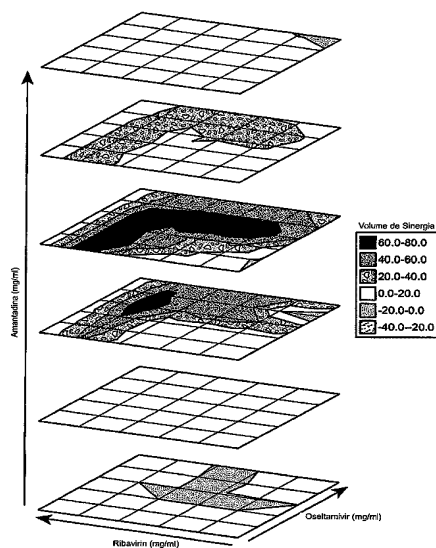
(73) Titular(es): Adamas Pharmaceuticals INC

(72) Inventor(es): David Chernoff, Gregory T. Went, Jack Nguyen, MICKEY S. URDEA, Paul Spence, ROWAN CHAPMAN, TERRY L. BURKOTH, Timothy J. Fultz

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2008056678 de 12/03/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/112775de 18/09/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMPOSIÇÕES E KITS PARA TRATAMENTO DE GRIPE".

Antecedentes da Invenção

O campo da invenção são combinações antivirais e seu uso para o tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente.

Quatro fármacos antivirais são atualmente aprovados pelo FDA para tratar gripe não-complicada, aguda. Os inibidores de M2 cloridrato de amantadina (SYMMETREL®) e rimantadina (FLUMADINE®) são aprovados para tratamento e prevenção de gripe A. Ambas a amantadina e a rimantadina são providas em comprimidos de 100 mg e xarope 50 mg/ml para administração oral. A dose para adulto comum para ambos os fármacos é 200 mg em duas doses divididas por dia (BID). A dose pediátrica de amantadina em pacientes de 1-9 anos de idade é 4,4 a 8,8 mg/kg/dia, não exceder 150 mg por dia; para rimantadina, a dose é 5 mg/kg administrada uma vez por dia (QD), não exceder 150 mg por dia.

Os inibidores de neuraminidase zanamivir (RELENZA®) e fosfato de oseltamivir (TAMIFLU®) são aprovados para tratamento e prevenção de gripes A e B. Zanamivir é provido para inalação oral apenas para uso com um dispositivo de inalação. A dose recomendada de zanamivir para profilaxia e tratamento de gripe é 10 mg/dia QD e 20 mg/dia BID, respectivamente. Fosfato de oseltamivir está disponível como uma cápsula contendo 75 mg de oseltamivir para uso oral e como um pó para suspensão oral, que quando constituído com água conforme ordenado contém 12 mg/ml de oseltamivir. A dose recomendada de oseltamivir para pacientes com mais de 13 anos de idade para profilaxia e tratamento de gripe é 75 mg/dia QD e 150 mg BID, respectivamente.

Várias combinações de fármacos antivirais foram propostas para tratamento de gripe. A Patente U.S. Nº 5.866.601 descreve combinação de composições de inibidor de neuraminidase com antivirais (tal como amantadina, rimantadina e ribavirina). Estudos de modelo de animal *in vitro* e *in vivo* sobre o efeito de várias combinações duplas de fármacos contra gripe foram relatados (vide, por exemplo, incluindo combinações de ribavirina com

amantadina (Wilson e outros, *Antimicrob. Agents Chemother* (1980) 17:642-648; Hayden e outros, *Antimicrob. Agents Chemother* (1980) 18:536-41; e Burlington e outros, *J. Antimicrob. Chemother* (1983) 11:7-14), rimantadina (Hayden e outros, *supra*; Galegov e outros, *Experientia* (1977) 33:905-906; e Madren e outros, *Antivir Chem Chemother* (1995) 6:109-113), paramavir (Smee e outros, *Chemotherapy* (2002) 48:88-93) e oseltamivir (Smee e outros, *Antiviral Chem. Chemother.* (2006) 17:185-92); e combinações de oseltamivir com amantadina (Ilyushina e outros, *Antiviral Res.* (2006) 70:121-31) e rimantadina (Govorkova e outros, *Antimicrob. Agents Chemother* (2004) 48:4855-4863; Galabov e outros, *Antivir. Chem. Chemother.* (2006) 17:251-8; e Leneva e outros, *Antiviral Res.* (2000) 48:101-15). Vários desses trabalhos relataram que combinações de ribavirina e amantadina têm aditivo para efeito sinérgico contra vírus da gripe comparado com tratamento com os fármacos sozinhos (vide, por exemplo, Wilson e outros, *supra*; Hayden e outros, *supra*; e Burlington e outros, *supra*). Em alguns dos estudos, os tratamentos de combinação são relatados ter resultados adversos comparado com os tratamentos de monoterapia. Por exemplo, a combinação de oseltamivir e rimantadina em concentrações baixas de cada fármaco foi relatada resultar em uma interação antagonística contra o vírus da gripe A (Govorkova e outros, *supra*). Smee e outros (2006) relataram que o tratamento de camundongos infectados com vírus da gripe A com a combinação de oseltamivir mais ribavirina não foi melhor do que ribavirina usada sozinha, e que quando os tratamentos foram iniciados três a quatro dias pós-infecção, os grupos tratados com a combinação tinham menos sobreviventes do que os animais tratados com ribavirina sozinha.

Resistência viral aos inibidores de M2 rimantadina e amantadina pode emergir rapidamente durante tratamento porque certas mutações por ponto únicas na proteína M2 podem conferir resistência a ambas a amantadina e a rimantadina. Em janeiro de 2006, teste CDC revelou que uma alta proporção de vírus da gripe A circulando nos Estados Unidos era resistente à amantadina e rimantadina, fazendo com que o CDC recomendasse contra o uso desses fármacos para o tratamento e profilaxia de Gripe (*CDC Health*

Alert, 14 de janeiro de 2006). Atualmente, oseltamivir é considerado um tratamento de linha de frente para vírus da gripe A. No entanto, cepas resistentes a oseltamivir foram relatadas (de Jong e outros, *N. Engl. J. Med.* (2005) 353:2667-72; *Euro Surveill.* (2005)10(10):E051020.2) gerar preocupações que cepas patogênicas, transmissíveis, poderiam reduzir os benefícios de uso de antiviral em controle pandêmico (Lipsitch e outros, *PLoS Med.* (2007) 23 de janeiro; 4(1):e15 [*Epub ahead of print*]). Ainda, tratamento com oseltamivir foi ligado a sérios eventos neuropsiquiátricos, especialmente em pacientes pediátricos (vide *Prescrire Int.* (2006) 15:182-3).

10 Em vista do acima, um objetivo da invenção é prover agentes terapêuticos aperfeiçoados para tratamento ou profilaxia de gripe, particularmente gripe pandêmica e/ou cepas de gripe que são resistentes a um inibidor de M2 e/ou inibidor de neuraminidase.

15 Outro objeto da presente invenção é prover agentes terapêuticos aperfeiçoados para tratamento ou profilaxia de gripe que previne a geração de cepas resistentes a fármaco em um paciente ou população.

20 Outro objeto da invenção é prover agentes terapêuticos aperfeiçoados para tratamento ou profilaxia de gripe que têm significativamente menos ou quaisquer efeitos adversos ou efeitos tóxicos comparado com monoterapias atuais.

Sumário da Invenção

25 Um aspecto da invenção é uma composição para o tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente, a dita composição compreendendo: 10-60 por cento em peso (% em peso), 25-50% em peso ou 50-75% em peso de amantadina ou rimantadina; e 30-80% em peso, 50-75% em peso ou 25-50% em peso de ribavirina ou viramidina, onde as porcentagens em peso são baseadas no peso total de agentes ativos na composição. Em modalidades específicas, a composição compreende ainda 0,5-30% em peso de oseltamivir.

30 Em uma modalidade, a composição é uma formulação adequada para administração oral ou gástrica, tal como um líquido, xarope, suspensão, comprimido, cápsula, contas em cápsulas ou contas em sachês. Em uma

modalidade específica, a composição está em uma forma de dosagem unitária para administração oral compreendendo 25-125 mg de amantadina ou rimantadina e 50-200 mg de ribavirina ou viramidina. Em uma modalidade específica, a forma de dosagem unitária compreende pelo menos 125 mg de amantadina em uma forma de liberação prolongada e menos do que 200 mg de ribavirina. Em outra modalidade a forma de dosagem unitária compreende 25-125 mg de amantadina e 50-200 mg de ribavirina.

Em outra modalidade, a composição está em uma forma adequada para administração parenteral, tal como um pó liofilizado, que é reconstituído antes da administração, ou um líquido estéril em um frasco.

Outro aspecto da invenção é um kit para o tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente compreendendo amantadina ou rimantadina, e ribavirina ou viramidina, e opcionalmente um inibidor de neuraminidase tal como oseltamivir, zanamivir ou peramivir.

Em uma modalidade específica, é provido um kit para o tratamento ou profilaxia oral de gripe em um paciente compreendendo uma pluralidade de formas de dosagem, a dita pluralidade constituindo uma ou mais doses, cada dose compreendendo uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de uma combinação de ribavirina e amantadina. A amantadina e a ribavirina podem ser formuladas como formas de dosagem separadas ou co-formuladas como formas de dosagem únicas. A amantadina pode estar em uma forma de liberação prolongada. Em uma modalidade específica, a amantadina e a ribavirina são formuladas como formas de dosagem separadas, com cada forma de dosagem de amantadina compreendendo 75-250 mg de amantadina e cada forma de dosagem de ribavirina compreendendo 50-200 ou 100-400 mg de ribavirina. Em várias modalidades, um kit compreende uma forma de dosagem de amantadina em uma resistência de dosagem selecionada de 80 mg, 180 mg e 330 mg e uma forma de dosagem de ribavirina em uma resistência de dosagem selecionada do grupo consistindo em 115 mg, 330 mg e 660 mg. Em uma modalidade, cada dose compreende ainda oseltamivir.

Em outra modalidade, o kit é provido para tratamento parenteral

de gripe em um paciente humano compreendendo amantadina em uma forma adequada para administração parenteral; e ribavirina em uma forma adequada para administração parenteral. A amantadina pode estar contida em uma pluralidade de primeiros frascos e a ribavirina contida em uma pluralidade de segundos frascos. Alternativamente, a amantadina e a ribavirina são co-formuladas e contidas em uma pluralidade de frascos. O kit pode compreender ainda oseltamivir, peramivir ou zanamivir em uma forma adequada para administração parenteral.

Outro aspecto da invenção é um método para o tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente, o dito método compreendendo: administração ao paciente de uma quantidade eficaz de uma combinação de três agentes antivirais diferentes tendo três mecanismos de ação diferentes correspondentes selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor de polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico em gripe e inibidor de neuraminidase.

Em uma modalidade específica, o método compreende administração ao paciente de uma quantidade eficaz de uma combinação de primeiro, segundo e terceiro agentes antivirais compreendendo: a) um inibidor de M2 selecionado do grupo consistindo em rimantadina e amantadina; b) um inibidor de polimerase de RNA selecionado do grupo consistindo em ribavirina e viramidina; e c) um inibidor de neuraminidase (NAi) selecionado do grupo consistindo em oseltamivir, zanamivir e peramivir.

Em uma modalidade preferida os primeiro e segundo agentes antivirais são administrados em quantidades que aumentam a sensibilidade de um vírus da gripe ao terceiro agente antiviral em pelo menos 2 vezes a sensibilidade do vírus ao terceiro agente antiviral quando usado como monoterapia. Em uma tal modalidade específica, os primeiro e segundo agentes antivirais são ribavirina e oseltamivir e o terceiro agente antiviral é amantadina.

Em uma modalidade do método, os agentes antivirais são administrados ao paciente através de um método selecionado do grupo consis-

tindo em oralmente, parenteralmente, através de inalação e combinações dos mesmos.

Em uma modalidade específica, o paciente é administrado com amantadina ou rimantadina em uma quantidade para manter uma concentração no plasma entre 0,1 a 3,0 µg/ml, 0,1 a 1,5 µg/ml ou 0,3 a 1,5 µg/ml por pelo menos 48 horas contínuas.

Em outra modalidade, o paciente é administrado com amantadina ou rimantadina parenteralmente ou oralmente em uma quantidade de 5 a 500 mg/dia, 20 a 250 mg/dia, 100 a 800 mg/dia, 100 a 600 mg/dia, 200 a 700 mg/dia ou 200 a 500 mg/dia. Quando oralmente administrada, amantadina está opcionalmente em uma forma de liberação prolongada.

Em uma modalidade adicional, o paciente é administrado com amantadina através de infusão intravenosa em uma taxa de 1 a 50 mg/h, 3 a 40 mg/h ou 5 a 30 mg/h por pelo menos 48 horas contínuas.

Em uma modalidade, o paciente é administrado com ribavirina ou viramidina em uma quantidade para manter uma concentração no plasma entre 0,1 a 10,0 µg/ml, 0,5 a 8 µg/ml, 0,5 a 5,0 µg/ml, 1 a 6 µg/ml, 1 a 4 µg/ml, 2 a 6 µg/ml, 2 a 4 µg/ml, 0,01-2 µg/ml ou 0,2-2 µg/ml por pelo menos 48 horas contínuas. O paciente é administrado com ribavirina parenteralmente ou oralmente em uma quantidade de 50 a 2000 mg/dia, 50 a 1600 mg/dia, 100 a 1200 mg/dia, 400 a 800 mg/dia, 50 a 600 mg/dia, 75 a 500 mg/dia ou 75 a 200 mg/dia.

Em uma modalidade específica, o paciente é administrado com ribavirina através de infusão intravenosa em uma taxa de 5 a 200 mg/h, 10 a 150 mg/h, 15 a 100 ou 20 a 80 mg/h por pelo menos 48 horas contínuas.

Em uma modalidade específica, onde o paciente é administrado com amantadina ou rimantadina em uma das quantidades acima especificadas junto com ribavirina ou viramidina em uma das quantidades acima especificadas, o paciente é administrado ainda com um inibidor de neuraminidase selecionado do grupo consistindo em oseltamivir, carboxilato de oseltamivir, zanamivir e peramivir, em uma quantidade para manter uma concentração no plasma do inibidor de neuraminidase entre 0,001-5 µg/ml, 0,02 a 5 µg/ml,

0,1 a 3 µg/ml, 0,1 a 1 µg/ml, 0,3 a 3 µg/ml ou 0,4 a 1 µg/ml por pelo menos 48 horas contínuas.

Em uma modalidade específica, o paciente é administrado com zanamivir através de infusão intravenosa em uma taxa de 0,1 a 10 mg/h, 0,4 a 7 mg/h ou 1 a 5 mg/h por pelo menos 48 horas contínuas.

Em outra modalidade, o paciente é administrado com oseltamivir através de infusão intravenosa em uma taxa de 0,1 a 20 mg/h, 0,4 a 7 mg/h, 1 a 7 mg/h, 1 a 5 mg/h ou 2 a 7 mg/h por pelo menos 48 horas contínuas.

Em várias modalidades, o paciente pode ser administrado com oseltamivir parenteralmente ou oralmente em uma quantidade de 10 a 150 mg/dia, 10 a 50 mg/dia, 50 a 100 mg/dia, 75 a 150 mg/dia, 150 a 300 mg/dia, 100 a 500 mg/dia ou 1 a 50 mg/dia.

A invenção provê um primeiro agente antiviral, um segundo agente antiviral e um terceiro agente antiviral para administração separada ou sequencial simultânea, onde os três agentes têm três mecanismos de ação diferentes correspondentes, selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor da polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê um primeiro agente antiviral, um segundo agente antiviral e um terceiro agente antiviral para uso combinado em terapia, onde os três agentes antivirais têm três mecanismos de ação diferentes correspondentes, selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor da polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê um primeiro agente antiviral, um segundo agente antiviral e um terceiro agente antiviral para uso combinado no tratamento e/ou profilaxia de infecção por gripe, onde os três agentes antivirais têm três mecanismos de ação diferentes correspondentes, selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor da polimerase de RNA, oligo-

nucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê um primeiro agente antiviral, um segundo agente antiviral e um terceiro agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde os
5 três agentes antivirais têm três mecanismos de ação diferentes correspondentes, selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor da polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase. Conforme descrito abaixo, os três agentes podem ser
10 administrados separadamente um do outro ou em combinações duplas ou triplas.

A invenção também provê o uso de um agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidores de adsorção do vírus da gripe, inibidores de M2, inibidores de desidrogenase de IMP, inibidores de polimerase de RNA, oligonucleotídeos de interferência específicos de gripe e inibidores de neuraminidase, e onde o medicamento é preparado para administração (ou é administrado) a um paciente
15 em combinação com dois agentes antivirais adicionais, onde os três agentes antivirais têm mecanismos de ação diferentes, selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor de polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase.
20

A invenção também provê o uso de um primeiro agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o medicamento é preparado para administração (ou é administrado) a um paciente em combinação com um segundo agente antiviral e um terceiro agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e c) terceiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonu-
25
30

cleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê o uso de um segundo agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o medicamento é preparado para administração (ou é administrado) a um paciente em combinação com um primeiro agente antiviral e um terceiro agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e c) o agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê o uso de um terceiro agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o medicamento é preparado para administração (ou é administrado) a um paciente em combinação com um primeiro agente antiviral e um segundo agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e c) o agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê o uso de um primeiro e um segundo agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o medicamento é preparado para administração (ou é administrado) a um paciente em combinação com um terceiro agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção de vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e c) o terceiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê o uso de um ou mais agente(s) anti-

ral(ais) na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde os agentes antivirais têm mecanismos de ação diferentes, selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor de polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase, e onde o medicamento é preparado para administração (ou é administrado) a um paciente em combinação com um ou mais agentes antivirais adicionais de maneira que o paciente recebe três agentes antivirais tendo mecanismos de ação diferentes selecionados do dito grupo.

10 A invenção também provê o uso de um agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe em um paciente, onde o agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidores de adsorção de vírus da gripe, inibidores de M2, inibidores de desidrogenase de IMP, inibidores de polimerase de RNA, oligonucleotídeos de interferência específicos de gripe e inibidores de neuraminidase, e onde o paciente foi previamente tratado com pelo menos dois agentes antivirais adicionais, onde os ditos agentes antivirais têm mecanismos de ação diferentes, os ditos mecanismos de ação diferentes sendo selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção de vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor de polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase.

25 A invenção também provê o uso de um primeiro agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe em um paciente, onde o paciente foi previamente tratado com um segundo agente antiviral e, opcionalmente, um terceiro agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e c) o terceiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê o uso de um segundo agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe em um paciente, onde o paciente foi previamente tratado com um primeiro agente antiviral e, opcionalmente, um terceiro agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção de vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e c) o terceiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

A invenção também provê o uso de um terceiro agente antiviral na fabricação de um medicamento para o tratamento e/ou profilaxia de uma infecção de gripe em um paciente, onde o paciente foi anteriormente tratado com um primeiro agente antiviral e um segundo agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e c) o terceiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

Nesses usos, o tratamento anterior do paciente não terá sido de mais do que 7 dias antes da administração do dito medicamento (por exemplo, nos 7, 6, 5, 4, 3, 2 dias anteriores ou nas 24 horas anteriores).

A invenção também provê um agente antiviral para uso no tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidores de adsorção do vírus da gripe, inibidores de M2, inibidores de desidrogenase de IMP, inibidores de polimerase de RNA, oligonucleotídeos de interferência específicos de gripe e inibidores de neuraminidase, e onde o agente antiviral é administrado (ou é preparado para administração) com pelo menos um agente antiviral adicional, onde os ditos agentes antivirais têm mecanismos de ação diferentes, o dito mecanismo de ação diferente sendo selecionado do grupo consistindo em

inibidor de absorção do vírus da gripe, inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor de polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase.

5 A invenção também provê um primeiro agente antiviral para uso no tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o primeiro agente antiviral é administrado (ou é preparado para administração) com um segundo agente antiviral e, opcionalmente, um terceiro agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é
10 selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e c) o terceiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

15 A invenção também provê um segundo agente antiviral para uso no tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o segundo agente antiviral é administrado (ou é preparado para administração) com um primeiro agente antiviral e, opcionalmente, um terceiro agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de absorção do vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é
20 selecionado do grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e o inibidor de polimerase de RNA; e c) o terceiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

25 A invenção também provê um terceiro agente antiviral para uso no tratamento e/ou profilaxia de infecção de gripe, onde o terceiro agente antiviral é administrado (ou é preparado para administração) com um primeiro agente antiviral e um segundo agente antiviral, onde: a) o primeiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe e inibidor de M2; b) o segundo agente antiviral é selecionado do
30 grupo consistindo em inibidor de desidrogenase de IMP e inibidor de polimerase de RNA; e o terceiro agente antiviral é selecionado do grupo consistindo em oligonucleotídeo de interferência e inibidor de neuraminidase.

Breve Descrição das Figuras

As Figuras 1A-4 são uma visão de cima de seis embalagens *blister* respectivas diferentes compreendendo formas de dosagem de acordo com modalidades diferentes da presente invenção.

- 5 A Figura 5 é um gráfico de volume de sinergia dos dados gerados a partir do experimento descrito no Exemplo 1B.

Descrição Detalhada da Invenção

A invenção provê métodos, usos, composições e kits para tratamento de um paciente humano tendo uma infecção pelo vírus da gripe ou
10 suspeito de estar infectado com ou sob risco de exposição ao vírus da gripe. A invenção pode ser usada para prevenir ou reduzir a probabilidade da geração de cepas resistentes a fármaco, para tratar um paciente humano suspeito de estar infectado com ou sob risco de exposição a um vírus da gripe resistente a fármaco e para minimizar os efeitos colaterais e toxidez associados com monoterapia.
15

Um aspecto da invenção é um método para o tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente para reduzir ou prevenir sintomas associados com infecção de vírus da gripe. O paciente pode ser humano ou qualquer outro animal suscetível à infecção por gripe (por exemplo, animais domésticos tal como gatos e cachorros; animais de fazenda tal como cavalos, vacas, porcos, galinhas, etc.). Padrões de cuidado médico são usados para
20 determinar que um paciente está provavelmente infectado com vírus da gripe ou está sob risco de exposição a vírus da gripe. O vírus da gripe pode ser um vírus A ou B. Em modalidades específicas, o vírus é vírus da gripe A (por exemplo, H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H9N2, etc.).
25

O método compreende administração ao paciente de uma combinação de três agentes antivirais diferentes (referida aqui como "combinação tripla") tendo três mecanismos de ação diferentes correspondentes selecionados do grupo consistindo em inibidor de adsorção do vírus da gripe,
30 inibidor de M2, inibidor de desidrogenase de IMP, inibidor de polimerase de RNA, oligonucleotídeo de interferência específico de gripe e inibidor de neuraminidase. Um ou mais agentes antivirais adicionais podem ser adicionados

à combinação tripla (por exemplo, um quarto agente antiviral tendo um mecanismo de ação que difere dos três mecanismos da combinação tripla ou que é igual a um dos mecanismos da combinação tripla). Referências aqui a agentes antivirais específicos (por exemplo, amantadina, oseltamivir, etc.) pretendem incluir sais farmacologicamente aceitáveis dos agentes antivirais (por exemplo, cloridrato de amantadina, fosfato de oseltamivir, etc.).

Os agentes antivirais são de preferência administrados em razões e dosagens relativas demonstradas ser aditivas ou sinérgicas com relação a uma redução em carga viral, sintomas, duração de doença, prevenção de cepas resistentes a fármaco, etc. Sinergia é quando a eficácia da combinação é maior do que a eficácia cumulativa de cada fármaco dentro da combinação como agentes sozinhos (Prichard e Shipman, *Antiviral Res.* (1990) 14:181-206). Métodos para medição de sinergia de fármaco de agentes antivirais são descritos nos Exemplo abaixo e são geralmente conhecidos na técnica (vide, por exemplo, Schinazi e outros, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1982) 22:499-507; e Prichard e Shipman, *supra*; e Prichard e outros, *Antimicrob. Agent Chemother* (1993) 37:540-545; cada um aqui incorporado a título de referência). A Figura 5 mostra um gráfico de sinergia tridimensional de dados obtidos a partir do experimento descrito no Exemplo 1B abaixo; a análise foi feita usando métodos descritos por Prichard e outros (1993), *supra*.

O uso de quantidades sinérgicas dos agentes antivirais provê maior eficácia e/ou permite quantidades menores de um ou mais dos fármacos a serem usados do que aquelas usadas em monoterapia atual, terapia resultando em efeitos colaterais menores para paciente e permitindo a produção de mais doses de tratamento a partir de quantidade finita de fármaco bruta. Em uma modalidade específica, a combinação aumenta a sensibilidade de uma ou mais cepas de um vírus da gripe a pelo menos um dos agentes antivirais em pelo menos 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes comparado com a sensibilidade do vírus ao fármaco quando usado como uma monoterapia. Por exemplo, quando um fármaco tem uma EC_{50} de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ contra um vírus da gripe quando usado como uma mono-

terapia conforme determinado através de teste *in vitro* e tem uma EC₅₀ de 0,01 µg/ml ou menos quando usado em combinação com dois outros agentes antivirais, a combinação é dita aumentar a sensibilidade do vírus da gripe ao fármaco em pelo menos 100 vezes. De preferência, a sensibilidade de dois ou todos os três fármacos na combinação é melhorada em pelo menos 2 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes ou 100 vezes. O Exemplo 1B abaixo descreve um ensaio *in vitro* para determinação de como aumentos de sensibilidade a fármaco podem ser determinados usando uma cepa de gripe H3N2. O mesmo ensaio pode ser usado para medir sensibilidade a fármaco contra outras cepas de gripe. Na ausência de sinergia, combinações de antivirais podem ser ainda benéficas devido à contribuição aditiva de cada fármaco dentro da combinação e a eficácia geral da combinação sem toxidez adicionada.

Uso da combinação tripla reduz significativamente a probabilidade da geração de cepas resistentes a fármaco comparado com monoterapias anteriores. Isto é particularmente vantajoso no tratamento de gripe em um surto pandêmico ou localizado. Ainda, a combinação tripla pode ser usada para tratar um paciente humano infectado com ou sob risco de exposição a um vírus da gripe resistente a fármaco. Devido ao fato de que genotipificação rápida não está geralmente disponível em uma base de tempo real para médicos permitindo seleção de fármaco lógica com base em perfis de resistência, a invenção provê cobertura antiviral ampla e eficaz mesmo na ausência desses dados. Em modalidades específicas, o vírus da gripe resistente a fármaco é resistente a um dos fármacos da combinação usada. Surpreendentemente, tratamento com uma combinação tripla provê um efeito antigripe maior contra vírus resistente a fármaco do que tratamento que é igual exceto pela exclusão do fármaco para o qual o vírus é resistente como uma monoterapia. Procedimentos médicos padrão são usados para avaliar a probabilidade de que um paciente esteja infectado com ou esteja sob risco de exposição a um vírus resistente a fármaco (por exemplo, através da orientação do *CDC Health Alerts*, etc.).

De preferência cada fármaco na combinação é ativo em uma

fase diferente no ciclo de vida do vírus da gripe. Por exemplo, inibidores de adsorção do vírus da gripe e inibidores de M2 são ativos no início do ciclo de vida; inibidores de desidrogenase de IMP e inibidores de polimerase de RNA são ativos no meio do ciclo de vida; e oligonucleotídeos de interferência e inibidores de neuraminidase são ativos no final do ciclo de vida.

Exemplos de inibidores de absorção do vírus da gripe incluem anticorpos monoclonais específicos de hemaglutinina (vide, por exemplo, Palladino e outros, *J. Virol.* (1995) 69:2075-81), polioxometalatos (vide, por exemplo, Shigeta e outros, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1997) 41:1423-7), polissacarídeo sulfatados, proteínas de fusão sialidase (por exemplo, Fludase) e O-glicosídeos de ácido siálico (vide, por exemplo, Guo e outros, *Glycobiology* (2002) 12:183-90). Esses e outros inibidores de adsorção de gripe são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, *Combating the Threat of Pandemic Influenza: Drug Discovery Approaches*, Ed. Paul F. Torrence, John Wiley and Sons Ltd. (2007), incorporado aqui a título de referência.

Exemplos de inibidores de M2 incluem compostos aminoadamantano tal como amantadina (1-amino-adamantano), rimantadina (1-(1-aminoetil)adamantano), espiro[ciclopropano-1,2'-adamantan]-2-amina, espiro[pirrolidina-2,2'-adamantano], espiro[piperidina-2,2'-adamantano], 2-(2-adamantil)piperidina, 3-(2-adamantil)pirrolidina, 2-(1-adamantil)piperidina, 2-(1-adamantil)pirrolidina e 2-(1-adamantil)-2-metil-pirrolidina; e anticorpos monoclonais específicos de M2 (vide, por exemplo, US 20050170334; e Zebede e Lamb, *J. Virol.* (1988) 62:2762-72). Em uma modalidade preferida, um dos agentes antivirais na combinação tripla é amantadina ou rimantadina.

Exemplos de inibidores de desidrogenase de IMP incluem ribavirina, viraamidina (um pró-fármaco de ribavirina) e merimepodibe ((VX-497; vide, por exemplo, Markland e outros, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) 44:859-66).

Conforme aqui usado, o termo inibidor de polimerase de RNA refere-se a um agente antiviral que inibe a atividade de polimerase, protease e/ou endonuclease do complexo de polimerase de RNA viral ou uma de suas

subunidades (isto é, PB1, PB2 e PA). Inibidores de polimerase de RNA e-
xemplares incluem análogos de nucleosídeo antivirais tal como ribavirina,
viramidina, 6-flúor-3-hidróxi-2-pirazinocarboxamida (T-705), 2'-desóxi-2'-
fluorguanosina, pirazofurina, 3-desazaguanina, carbodina (vide, por exem-
5 plo, Shannon e outros, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1981) 20:769-76) e
cicloopenil citosina (vide, por exemplo, Shigeta e outros, *Antimicrob. Agents
Chemother.* (1988) 32:906-11); e o inibidor de endonuclease flutimida (vide,
por exemplo, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1996) 40:1189-93). Em uma
modalidade preferida, um dos agentes antivirais na combinação tripla é riba-
10 virina ou viramidina.

Exemplos de oligonucleotídeos de interferência específicos de
gripe incluem siRNAs (vide, por exemplo, Zhou e outros, *Antiviral Res.*
(2007) 76:186-93), oligonucleotídeos de antissenso, oligonucleotídeos de
fosforotioato, ribozimas (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.258.585 para
15 Draper), oligômeros de morfolino e ácidos nucleicos de peptídeo (vide, por
exemplo, Schubert e Kurreck, *Handb Exp. Pharmacol.* (2006) 173:261-87).

Exemplos de inibidores de neuraminidase incluem oseltamivir,
carboxilato de oseltamivir (GS4071; vide, por exemplo, Eisenberg e outros,
Antimicrob. Agents Chemother. (1997) 41:1949-52), zanamivir, peramivir
20 (RWJ-27021; BXC-1812, BioCryst), ácido 2,3-didesidro-2-desóxi-N-acetil-
neuramínico (DANA), ácido 2-desóxi-2,3-desidro-N-trifluoracetilneuramínico
(FANA), A-322278 e A-315675 (vide Patente U.S. Nº 6.455.571 para Maring
e outros, e Kati e outros, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2002) 46:1014-21).
Em uma modalidade preferida, um dos agentes antivirais na combinação
25 tripla é oseltamivir, peramivir ou zanamivir.

Em uma modalidade, o primeiro agente antiviral é um inibidor de
M2, de preferência amantadina; o segundo agente antiviral é um análogo de
nucleosídeo antiviral, de preferência ribavirina ou viramidina; e o terceiro a-
gente antiviral é um inibidor de neuraminidase, de preferência oseltamivir ou
30 zanamivir. Em outra modalidade, o primeiro agente antiviral é amantadina ou
rimantadina; o segundo agente viral é ribavirina ou viramidina e o terceiro
agente antiviral é oseltamivir, carboxilato de oseltamivir, peramivir ou zana-

mivir.

Cada agente antiviral da combinação é administrado usando uma ou mais vias de administração adequadas para o agente particular (por exemplo, oralmente, parenteralmente, através de inalação, transdermalmente, intranasalmente, administração gástrica (por exemplo, através de tubos de alimentação G-, NG-, J-, etc.) etc.). Em várias modalidades, os agentes antivirais são preparados para administração oral e/ou administração gástrica (por exemplo, através de tubos de alimentação) como líquidos, xaropes, suspensões, comprimidos, cápsulas, contas em cápsulas ou contas em sachê. Em algumas modalidades, pelo menos um dos agentes antivirais é administrado através de uma via de administração (por exemplo, parenteralmente) e pelo menos um dos agentes antivirais é administrado através de uma via de administração alternativa (por exemplo, oralmente ou através de inalação).

Em modalidades de dosagem oral, um ou mais dos agentes antivirais podem ser providos em uma forma de liberação imediata (IR) ou liberação prolongada (ER). A preparação de formas de dosagem ER (também referidas na técnica como formas de dosagem de "liberação controlada", "liberação sustentada" e "liberação modificada") é bem conhecida. Formas de dosagem ER de inibidor de M2 adequadas são descritas na USSN 11/285.905 e na USSN 11/399.879, ambas para Went e outros, cujos conteúdos são aqui incorporados a título de referência. Os agentes antivirais podem ser administrados como formulações separadas, simultaneamente, ou sequencialmente. Alternativamente dois ou mais dos agentes antivirais podem ser providos como composições de combinação em formas de dosagem únicas.

Quando tratando uma infecção por vírus da gripe estabelecida em um paciente apresentando sintomas de vômito e/ou diarreia, administração parenteral é particularmente preferida, uma vez que administração oral pode não ser eficaz em atingir rapidamente a concentração desejada no plasma dos agentes antivirais. De preferência, a administração parenteral é selecionada de infusão intravenosa, injeção intravenosa ou injeção intra-

muscular. Mais preferida é uma infusão intravenosa. Um kit preferido para administração parenteral compreende um inibidor de M2 (amantadina ou rimantadina), e análogo de nucleosídeo antiviral (ribavirina ou viramidina), e opcionalmente um inibidor de neuraminidase (oseltamivir, carboxilato de oseltamivir e zanamivir), que são parenteralmente administrados junto com um veículo farmacologicamente aceitável em uma composição farmacêutica única. Em outras modalidades, o inibidor de M2, o análogo de nucleosídeo antiviral e opcionalmente o inibidor de neuraminidase são parenteralmente administrados como formas de dosagem separadas. Em algumas modalidades, pelo menos um do inibidor de M2, do análogo de nucleosídeo antiviral e do inibidor de neuraminidase, se presente, é inicialmente provido na forma de uma composição liofilizada que é reconstituída com um veículo farmacologicamente aceitável antes da administração parenteral. Em algumas modalidades, o inibidor de M2, o análogo de nucleosídeo antiviral e o inibidor de neuraminidase, se presente, são cada um inicialmente providos em um recipiente separado e, em seguida, são combinados com um veículo farmacologicamente aceitável antes da administração parenteral. Em algumas modalidades, um dos agentes antivirais pode ser provido em forma liofilizada que é reconstituída por uma formulação líquida de um dos outros agentes antivirais.

A concentração no plasma de cada fármaco na combinação tripla é de preferência mantida entre uma C_{\min} e uma C_{\max} desejada por pelo menos 24, 48, 72, 96, 120, 144 ou 168 horas contínuas. Testes clínicos de rotina são usados para determinar as concentrações no plasma médias C_{\min} , C_{\max} e $C_{\text{média}}$ de uma população de paciente através de vários regimes de dosagem. A duração da terapia é tipicamente 5-10 dias para tratamento ou até que o vírus tenha sido eliminado do paciente. Para profilaxia, a dose diária dos agentes antivirais administrados é tipicamente 50% daquela usada para tratamento e é administrada durante o curso de duas ou mais semanas, tipicamente até cerca de 6 semanas ou mais até o risco de infecção diminuir.

A invenção é exemplificada mais abaixo com relação aos usos de agentes antivirais específicos e combinações de agentes antivirais e as

dosagens e concentrações nas quais eles são usados. Dosagens e concentrações adequadas dos agentes antivirais que não são exemplificadas mais abaixo podem ser determinadas usando informação disponível na literatura e através de experimentação de rotina, tal como descrito nos exemplos abaixo e conhecido geralmente na técnica.

Em uma modalidade específica da invenção, o primeiro agente antiviral da combinação tripla é amantadina ou rimantadina, que é administrado ao paciente em uma quantidade que mantém uma concentração no plasma de amantadina ou rimantadina entre 0,05 µg/ml (C_{min}) a 5,0 µg/ml (C_{max}), de preferência 0,1 a 3,0 µg/ml, com mais preferência 0,1 a 1,5 µg/ml e com mais preferência 0,3 a 1,5 µg/ml por pelo menos 48 horas contínuas. A concentração desejada no plasma pode ser conseguida administrando a amantadina ou rimantadina parenteralmente ou oralmente em uma quantidade de 5 a 500 mg/dia, 20 a 250 mg/dia, 100 a 800 mg/dia, 100 a 600 mg/dia, 200 a 700 mg/dia ou 200 a 500 mg/dia. Dosagens orais diárias particularmente preferidas variam de a partir de cerca de 50-400 mg/dia, 75-300 mg/dia, 100-250 mg/dia ou 100-200 mg/dia.

Em algumas modalidades, formas de dosagem oral de amantadina e rimantadina exemplares contêm pelo menos cerca de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ou 200 mg por forma de dosagem e até cerca de 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 350 ou 400 mg por forma de dosagem. Uma, duas, três ou quatro das ditas formas de dosagem podem ser administradas uma ou duas vezes por dia para profilaxia ou tratamento. As doses diárias resultantes podem ser pelo menos 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ou 200 mg por dia e até cerca de 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400, 450, 500, 550, 660, 650, 700, 750 ou 800 mg/dia. Em um tratamento exemplar, o paciente auto-administra duas formas de dosagem unitárias ER de amantadina de 125 mg (por exemplo, cápsulas ou comprimidos) a cada doze horas (por exemplo, BID) para um total de cerca de 500 mg/dia de amantadina, tipicamente tomadas em combinação com ribavirina conforme descrito abaixo. Também neste exemplo, a dose profilática é uma forma de dosagem ER de 125 mg BID.

Para administração oral de 200 mg/dia ou mais de amantadina ou rimantadina, formulações ER são preferidas uma vez que elas permitem razões C_{max}/C_{min} menores, deste modo otimizando os tempos que as concentrações de inibidor de M2 permanecem acima da ED_{50} , enquanto minimizando toxidez. Em uma formulação ER preferida, a amantadina ou rimantadina tem um perfil de dissolução *in vitro* menor do que cerca de 70% em peso em uma hora, menor do que cerca de 90% em peso em duas horas, maior do que cerca de 40% em peso em seis horas e maior do que cerca de 85% em peso em 12 horas, conforme medido usando um sistema de dissolução do tipo 2 USP (pá) a 50 rpm, em uma temperatura de $37\pm 0,5^{\circ}C$ com 500 ml de água como um meio de dissolução. Ainda preferida é uma formulação ER de amantadina e rimantadina com um perfil de dissolução *in vitro* menor do que 20% em peso em uma hora, menor do que cerca de 50% em duas horas, maior do que cerca de 40% em seis horas e maior do que cerca de 90% em doze horas conforme acima medido. Esta redução em dissolução pode reduzir vantajosamente a variabilidade interdose em concentração no plasma para o agente ativo ou melhorar a tolerabilidade do agente ativo, especialmente quando administração é BID ou QD. Em certas modalidades, a amantadina ou rimantadina está em uma forma de dosagem oral e tem um T_{max} de pelo menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ou 20 horas.

Em uma modalidade específica, o paciente é administrado com amantadina através de infusão intravenosa em uma taxa de 1 a 50 mg/h, 3 a 40 mg/h ou 5 a 30 mg/h por pelo menos 48, 72 ou 96 horas contínuas.

Em uma modalidade da invenção, o segundo agente viral da combinação tripla é ribavirina ou viramidina. Em uma modalidade preferida, a ribavirina ou a viramidina é administrado junto com amantadina ou rimantadina nas quantidades mencionadas acima. A ribavirina ou a viramidina é administrada ao paciente em uma quantidade para atingir uma concentração no plasma de 0,1 $\mu g/ml$ (C_{min}) a 10,0 $\mu g/ml$ (C_{max}), 0,5 a 8 $\mu g/ml$, 0,5 a 5 $\mu g/ml$, 1 a 6 $\mu g/ml$, 1 a 4 $\mu g/ml$, 2 a 6 $\mu g/ml$, 2 a 4 $\mu g/ml$, 0,01-2 $\mu g/ml$ ou 0,2-2,0 $\mu g/ml$ por pelo menos 48, 72 ou 96 horas contínuas. A concentração no

plasma desejada pode ser alcançada através da administração da ribavirina parenteralmente ou oralmente em uma quantidade de 50 a 2400 mg/dia, 50 a 2000 mg/dia, 50 a 1600 mg/dia, 100 a 1200 mg/dia, 400 a 800 mg/dia, 50 a 600 mg/dia, 75 a 500 mg/dia ou 75 a 200 mg/dia. Em uma modalidade preferida, a ribavirina ou a viramidina é administrada em dosagens diárias baixas que têm efeito aditivo ou sinérgico quando administrados em combinação com amantadina ou rimantadina e um inibidor de neuraminidase tal como oseltamivir, peramivir ou zanamivir. As dosagens baixas são tipicamente cerca de 10-800 mg/dia, 25-600 mg/dia, 50-600 mg/dia e de preferência cerca de 75-500 mg/dia. Em um tratamento exemplar, a paciente auto-administra uma forma de dosagem unitária de ribavirina de 160 mg BID por um total de 320 mg/dia de ribavirina.

Em uma modalidade específica, a ribavirina ou a viramidina é administrada oralmente em quantidades de pelo menos cerca de 10, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ou 200 mg por forma de dosagem e até cerca de 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 ou 500 mg por forma de dosagem. Uma, duas, três ou quatro das ditas formas de dosagem podem ser administradas uma ou duas vezes por dia para profilaxia ou tratamento. As doses diárias resultantes podem ser pelo menos 10, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ou 200 mg por dia e até cerca de 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 1200, 1600 ou 2000 mg/dia. Em um tratamento exemplar, o paciente auto-administra formas de dosagem 2 x 200 mg BID para um total de cerca de 800 mg por dia. Também neste exemplo, a dose profilática é forma de dosagem 1 x 200 mg BID.

A ribavirina ou a viramidina (e opcionalmente um ou ambos os outros agentes antivirais) pode ser administrada inicialmente em quantidade de dose de carga e então administrada em uma quantidade de dose de manutenção, onde a quantidade de dose de carga é cerca de 1,5 a cerca de 3 vezes a quantidade de dose de manutenção diária. A dose de carga pode ser administrada através de uma via que é igual ou diferente daquela da dose de manutenção subsequente. A dose de carga é de preferência adminis-

trada parenteralmente ou oralmente e com mais preferência parenteralmente. De preferência, a dose de carga é administrada como uma infusão intravenosa, injeção intravenosa ou injeção intramuscular. Com infusão intravenosa, a dose de carga pode ser alcançada usando uma concentração maior do agente antiviral na primeira bolsa i.v. infundida no paciente. Alternativa-
5 mente, a bolsa de infusão i.v. inicial pode ter a mesma concentração de agentes ativos que as bolsas i.v. subsequentes, mas ser administrada com uma taxa alta de infusão (por exemplo, 3-6 horas comparado com 8 horas).

Em uma modalidade específica, o paciente é administrado com ribavirina ou viramidina através de infusão intravenosa em uma taxa de 5 a
10 200 mg/h, 10 a 150 mg/h, 15 a 100 ou 20 a 80 mg/h por pelo menos 48, 72 ou 96 horas contínuas.

Em uma modalidade particular da invenção, a ribavirina ou viramidina é administrada junto com amantadina e oseltamivir no tratamento de um vírus da gripe que é resistente à monoterapia de amantadina ou oselta-
15 mivir.

Em uma modalidade da invenção, o terceiro agente antiviral da combinação tripla é um inibidor de neuraminidase selecionado do grupo consistindo em oseltamivir, carboxilato de oseltamivir, zanamivir e peramivir. Oseltamivir e zanamivir são particularmente preferidos. O inibidor de neuraminidase, de preferência oseltamivir ou zanamivir, é administrado ao paciente em uma quantidade para alcançar uma concentração no plasma entre 0,001 a 5 µg/ml, 0,02 µg/ml a 5 µg/ml, 0,1 a 3 µg/ml, 0,1 a 1 µg/ml, 0,3 a 3 µg/ml, 0,3 a 1 µg/ml, 0,001 a 0,1 µg/ml ou 0,0001 a 0,01 µg/ml por pelo me-
20 nos 48, 72 ou 96 horas contínuas. A concentração no plasma desejada pode ser alcançada através da administração de oseltamivir parenteralmente ou oralmente em uma quantidade de 10 a 150 mg/dia, 10 a 50 mg/dia, 50 a 100 mg/dia, 75 a 150 mg/dia, 150 a 300 mg/dia ou 100 a 500 mg/dia. Zanamivir é tipicamente administrado em uma quantidade de 25-150 mg/dia, de preferência 40-100 mg/dia.
25
30

Em uma modalidade preferida, o inibidor de neuraminidase é administrado em dosagens diárias baixas que têm efeito aditivo ou sinérgico

quando administrado em combinação com amantadina e ribavirina ou vira-
midina. Em modalidades específicas, efeito sinérgico é alcançado quando
concentrações no plasma de 0,15-1,5 µg/ml de amantadina, 0,0001-0,01
µg/ml de oseltamivir e 0,6-6 µg/ml de ribavirina são mantidas no paciente por
5 pelo menos 48, 72 ou 96 horas contínuas. Dosagens específicas que alcan-
çam essas concentrações no plasma são determinadas usando cálculos de
rotina e confirmadas através de testes clínicos. As dosagens baixas de osel-
tamivir são tipicamente cerca de 1-50 mg/dia, de preferência cerca de 1-25
mg/dia e com mais preferência cerca de 2,5-10 mg/dia. Em um tratamento
10 exemplar, um paciente auto-administra uma forma de dosagem unitária de
25 mg de oseltamivir tomado QD ou BID. Em modalidades preferidas, osel-
tamivir em qualquer uma das dosagens acima é tomado em combinação
com qualquer uma das quantidades acima descritas de amantadina e ribavi-
rina. Em uma modalidade específica, 25 mg de oseltamivir são tomados QB
15 ou BID junto com 160 mg de amantadina e 160 mg de ribavirina (ou em for-
mas de dosagem unitária separadas ou em uma forma de dosagem unitária
em combinação) que são também tomados QD ou BID. Em outra modalida-
de específica, 75 mg de oseltamivir são tomados QD ou BID junto com 100
mg de amantadina QD ou BID e 600 mg de ribavirina QD ou BID.

20 Em uma modalidade específica, o paciente é administrado com
oseltamivir através de infusão intravenosa em uma taxa de 0,1 a 20 mg/h,
0,4 a 7 mg/h, 1 a 7 mg/h, 1 a 5 mg/h ou 2 a 7 mg/h por pelo menos 48, 72 ou
96 horas contínuas. A concentração no plasma desejada de zanamivir pode
ser alcançada através da administração parenteral em uma quantidade de 5
25 a 250 mg/dia, 10 a 200 mg/dia ou 25 a 150 mg/dia. Em uma modalidade es-
pecífica, o paciente é administrado com zanamivir através de infusão intra-
venosa em uma taxa de 0,1 a 10 mg/h, 0,4 a 7 mg/h ou 1 a 5 mg/h por pelo
menos 48, 72 ou 96 horas contínuas.

30 Em uma modalidade específica, o paciente é administrado com
oseltamivir oralmente em uma quantidade de 1 a 75 mg/dia, 1 a 50 mg/dia, 1
a 25 mg/dia, 10 a 150 mg/dia, 50 a 100 mg/dia, 75 a 150 mg/dia ou 150 a
300 mg/dia. Em várias modalidades, a quantidade de oseltamivir administra-

da de acordo com a presente invenção, se presente, pode ser pelo menos cerca de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ou 150 mg por forma de dosagem e até cerca de 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 ou 200 mg por forma de dosagem. Uma, duas, três ou quatro das ditas formas de dosagem podem ser administradas uma ou duas vezes por dia para profilaxia ou tratamento. As doses diárias resultantes podem ser pelo menos 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ou 150 mg por dia e até cerca de 75, 100, 120, 140, 150, 160, 180, 200, 220, 240, 250, 260, 280 ou 300 mg por dia. Em um tratamento exemplar, o paciente auto-administra uma forma de dosagem de 75 mg BID para um total de cerca de 150 mg por dia; para profilaxia e dose é 75 mg tomada uma vez por dia a cada 24 horas (QD).

Em adição à terapia antiviral tripla, o paciente pode receber uma terapia adjunta para reforçar as respostas antivirais naturais. Terapias adjuntas exemplares incluem tratamento com interferon, interferon peguilado, vitamina D (vide, por exemplo, Cannell e outros, *Epidemiol. Infect.* (2006) 134:1129-40), geranilgeranilacetona (vide, por exemplo, Unoshima e outros, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2003) 47:2914-21), poli ICLC (vide, por exemplo, Wong e outros, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1995) 39:2574-6), Ampligen[®] e CpG-oligodesoxinucleotídeos (vide, por exemplo, Lopez e outros, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15 de novembro de 2006; 114(1-2):103-10). Tais terapias adjuntas podem ser particularmente benéficas para profilaxia de gripe. No entanto, para tratamento de infecções de gripe ativas pode ser desejado evitar certas terapias adjuntas (por exemplo, tratamento com interferon). Ao invés disso, os agentes antivirais podem ser administrados em conjunto com tratamentos anti-ímunes/anti-inflamatórios tal como corticosteroides (por exemplo, metilprednisolona, hidrocortisona, etc.) ou estatinas (por exemplo, atorvastatina, sinvastatina, etc.) para reduzir a probabilidade de uma "tempestade de citocina".

Outro aspecto da invenção é uma composição e uso da mesma para o tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente humano. Em várias modalidades, as composições são preparadas para administração oral, pa-

renteral ou gástrica (por exemplo, através de tubos de alimentação) como líquidos, xaropes, suspensões, comprimidos, cápsulas, contas em cápsulas ou contas em sachês.

5 Em uma modalidade específica, a composição compreende a-
mantadina ou rimantadina, e ribavirina ou viramidina, e opcionalmente osel-
tamivir em formas de dosagem únicas para administração oral, gástrica ou
parenteral. Em uma modalidade específica, uma forma de dosagem única
contém amantadina em qualquer uma das quantidades especificadas acima
(isto é, 25, 50, 75... 300 mg) em combinação com ribavirina em qualquer
10 uma das quantidades especificadas acima (isto é, 25, 50, 75... 500 mg) e
opcionalmente oseltamivir em qualquer uma das quantidades especificadas
acima (isto é, 25, 30, 40... 200 mg). Em uma modalidade, a composição
compreende uma combinação de ribavirina e amantadina ER que tem de
preferência um perfil de dissolução *in vitro* e/ou T_{max} conforme previamente
15 acima descrito.

Em uma modalidade, a composição compreende 10 a 60 por
cento em peso (% em peso), 25 a 50% em peso ou 50 a 75% em peso de
amantadina ou rimantadina; e 30 a 80% em peso, 50 a 75% em peso ou 25
a 50% em peso de ribavirina ou viramidina, onde as porcentagens em peso
20 são baseadas no peso total de agentes ativos na composição. A composição
pode compreender ainda 0,5-30% em peso de oseltamivir. Em modalidades
preferidas, a composição contém quantidades de amantadina e ribavirina
que exibem efeito aditivo ou sinérgico, conforme acima descrito, quando u-
sados em combinação tripla com um inibidor de neuraminidase tal como o-
seltamivir, peramivir ou zanamivir, para o tratamento ou profilaxia de gripe.
25

Para administração parenteral, a composição pode estar em
uma forma de pó liofilizado ou líquido estéril contido em um frasco. O frasco
pode ser equipado com um septo de borracha para permitir entrada de se-
ringa para reconstituição ou retirada dos teores do frasco.

30 Para administração oral, a composição pode estar em uma for-
ma de dosagem unitária tal como uma cápsula ou comprimido. Uma forma
de dosagem unitária exemplar para administração oral compreende 25-125

mg ou 150-300 mg de amantadina, opcionalmente em forma ER, e 50-200 mg de ribavirina em comprimidos ou cápsulas. Uma forma de dosagem da invenção compreende 160 mg de HCL de amantadina ER e 120 mg de ribavirina IR. Outra forma de dosagem exemplar é uma cápsula compreendendo

5 160 mg de amantadina e 160 mg de ribavirina e 75 mg de oseltamivir.

Outro aspecto da invenção são kits compreendendo um inibidor de M2 (por exemplo, amantadina ou rimantadina), análogo de nucleosídeo antiviral (por exemplo, ribavirina ou viramidina) e opcionalmente um inibidor de neuraminidase (por exemplo, peramivir, zanamivir ou oseltamivir). Os a-

10 gentes antivirais no kit podem ser providos em formas de dosagem separadas que são co-embaladas juntas, uma vez que isso pode maximizar a facilidade com a qual a quantidade terapêutica apropriada pode ser administrada a um indivíduo com necessidade dos mesmos.

Em uma modalidade específica, os kits compreendem sachês

15 contendo um ou mais dos agentes ativos. Os sachês podem conter contagens dos agentes ativos em uma quantidade de dose unitária adequada para administração oral, enteral ou gástrica (por exemplo, através de um tubo G-, NG- ou J-).

Quando providos como um kit para administração oral, os agentes antivirais podem ser providos em uma embalagem *blister*. Os *blisters* individuais podem conter um agente antiviral ou dois ou todos os três. Quando providos como uma embalagem *blister*, é preferido que os agentes antivirais a serem providos em cada intervalo de dosagem sejam identificados separadamente – isto pode ser realizado através de provisão de todas as

20 formas de dosagem para cada dose dentro de um único *blister* ou, se embaladas em *blister* separados, os *blisters* contendo as formas de dosagem para cada dose podem ser agrupados ou identificados como um grupo, por exemplo, através de impressão circundando os *blisters*. Tipicamente, o kit inclui instruções para uso. Em algumas modalidades, o kit pode incluir um ou

25 mais recipientes de um inibidor de M2 (por exemplo, amantadina) e análogo de nucleosídeo antiviral (por exemplo, ribavirina) em uma primeira embalagem e o inibidor de neuraminidase em uma segunda embalagem separada.

30

Por exemplo, o kit pode compreender amantadina e ribavirina co-embalados em uma primeira embalagem *blister* e cápsulas de oseltamivir de 75 mg em uma segunda embalagem *blister*. Tais kits podem ser preparados co-embalando embalagens *blister* de TAMIFLU® com embalagens *blister* compreendendo ribavirina e amantadina. Em outro kit da invenção, um fornecimento em volume de TAMIFLU® (por exemplo, um estoque do governo) é usado como uma fonte de oseltamivir. Os teores das cápsulas de TAMIFLU® são esvaziados, opcionalmente testados novamente quanto à estabilidade em vida de prateleira, então novamente encapsulados em quantidades de menos do que 75 mg/cápsula (por exemplo, 10, 25, 35, 50 mg) e co-embalados com quantidades aditivas ou sinérgicas de ribavirina ou amantadina. Prolongamento da vida de prateleira de oseltamivir e redução da dose diária necessária para tratamento ou profilaxia de gripe têm o benefício de prolongar bastante os estoques do governo de tratamento antiviral para gripe pandêmica.

Em uma modalidade, um kit compreendendo amantadina e ribavirina provido como uma pluralidade de formas de dosagem oral separadas, com cada forma de dosagem de amantadina compreendendo 75-250 mg de amantadina e cada forma de dosagem de ribavirina compreendendo 50-400 mg de ribavirina. Em uma modalidade específica, um kit pode compreender uma ou mais embalagens *blister* compreendendo uma ou mais formas de dosagem compreendendo 125 mg de cloridrato de amantadina em uma forma de dosagem de liberação prolongada e uma ou mais formas de dosagem compreendendo 200 mg de ribavirina. Os *blisters* na embalagem podem ser dispostos ou marcados de modo que um de cada tipo de forma de dosagem deve ser administrado uma ou duas vezes por dia. Alternativamente, as formas de dosagem nos *blisters* podem ser dispostas para indicar que uma das formas de dosagem de amantadina deve ser administrada duas vezes por dia e uma das formas de dosagem de ribavirina deve ser administrada uma vez por dia, ou as formas de dosagem nos *blisters* podem ser dispostas para indicar que duas das formas de dosagem de amantadina e uma das formas de dosagem de ribavirina devem ser administradas uma vez por dia. Opcio-

nalmente, a embalagem *blister* pode ser configurada para incluir uma ou mais formas de dosagem compreendendo 75 mg de oseltamivir similarmente configurada ou marcada para ser administrada uma vez ou duas vezes por dia. As Figuras 1 e 2 dos desenhos acompanhantes ilustram configurações representativas. Alternativamente, o kit pode ser formatado para otimizar seu uso convenientemente juntamente com um inibidor de neuraminidase comercialmente disponível (por exemplo, TAMIFLU®).

Em outra modalidade, pode ser provido um kit compreendendo uma ou mais embalagens *blister*, onde cada embalagem *blister* compreende um ou mais grupos de *blisters* e dentro de cada grupo de *blisters* um dos *blisters* contém uma ou duas formas de dosagem em comprimido ou cápsula compreendendo 60 a 300 mg de amantadina em uma formulação de liberação prolongada e um dos *blisters* contém uma ou duas formas de dosagem em comprimido ou cápsula compreendendo 25 a 200 mg de ribavirina. O número de grupos dentro de uma embalagem *blister* ou o número de grupos providos no kit pode variar de um a cerca de 5, 7, 10, 14, 15, 20, 21, 28, 30, 40, 42 ou 60. Opcionalmente, o dito kit inclui instruções para administração de uma ou duas vezes por dia.

Outro kit exemplar para administração oral de amantadina junto com ribavirina compreende formas de dosagem unitária de 80 mg, 180 mg ou 330 mg de amantadina em forma de liberação imediata ou liberação prolongada; e formas de dosagem unitária de 330 mg ou 660 mg de ribavirina. Em um tratamento exemplar um paciente é administrado com 660 a 2400 mg de RBV e 360 a 660 mg de amantadina como a primeira dose (por exemplo, Dia 1 Manhã); em seguida (por exemplo, Dia 2 Manhã até o Dia 10) o paciente é administrado com 660 a 1320 mg de RBV e 180 a 660 mg de amantadina uma vez por dia (QD).

Quando providos como um kit para tratamento parenteral dois ou mais dos agentes antivirais da combinação são providos em uma forma adequada para administração parenteral. Por exemplo, os agentes antivirais podem ser individualmente formulados ou co-formulados e cheios em recipientes adequados tal como seringas, ampolas ou frascos. Os agentes ativos

podem ser providos na forma de uma composição liofilizada em um recipiente e reconstituídos com um veículo farmacologicamente aceitável antes da administração parenteral. Em outras modalidades, os agentes ativos podem ser providos em uma forma líquida em um recipiente que pode ser administrada sem diluição (por exemplo, para administração de bólus i.v. ou i.m.) ou 5 alternativamente adicionados a uma bolsa de infusão i.v. Em algumas modalidades, um dos agentes antivirais pode ser provido em forma liofilizada, que, antes da administração a um paciente, é reconstituída com uma forma líquida de outro agente antiviral provido no kit. Em algumas modalidades, um 10 inibidor de M2 (por exemplo, amantadina ou rimantadina), análogo de nucleosídeo antiviral (por exemplo, ribavirina ou viremida) e inibidor de neuraminidase (por exemplo, oseltamivir, zanamivir ou peramivir), se presente, estão cada um em um recipiente separado, e em seguida os agentes ativos são combinados com um veículo farmacologicamente aceitável antes da administração 15 parenteral. Cada recipiente pode conter uma dose unitária do(s) agente(s) ativo(s), e cada kit pode ter um número suficiente de recipientes para tratar um paciente individual por pelo menos 12, 14, 48 ou 72 horas. O kit pode ter um recipiente distintamente marcado para uma dose de carga de um ou mais dos agentes ativos com instruções indicando que o recipiente 20 distintamente marcado é o primeiro usado quando iniciando o tratamento de um paciente. Alternativamente, doses de carga podem ser separadamente embaladas e podem ter instruções separadas para uso. Kits exemplares para tratamento oral são detalhados mais nos Exemplos 5-9 abaixo. Kits exemplares para administração parenteral são descritos no Exemplo 11 abaixo. 25

Exemplo 1A: Um estudo de resposta de dose da atividade antiviral de amantadina, oseltamivir e ribavirina, sozinhos e em combinações duplas e triplas, em células MDCK infectadas com A/Albany/1/98 (H3N2) cultivadas em frascos

30 A requerente realizou experimentos elaborados para avaliar a atividade antiviral de resposta de dose de uma combinação de amantadina, oseltamivir e ribavirina na inibição de replicação viral de A/Albany/1/98

(H3N2). Os objetivos do experimento foram demonstrar uma redução de carga viral comparado com nenhum fármaco e efeito sinérgico de combinações duplas e triplas comparado com monoterapia.

5 As EC_{25} , EC_{50} e EC_{75} (onde, por exemplo, EC_{50} , na concentração de fármaco que reduz 50% do vírus em 72 horas) para cada fármaco foram demonstradas em estudos de variação de dose usando cada fármaco como monoterapia. Resumidamente, compostos em doses variáveis foram adicionados a células MDCK cultivadas em frascos usando métodos previamente descritos (Smee e outros, *Chemotherapy* (2002) 48:88-93). Trinta minutos após a adição do fármaco, os vírus foram adicionados em uma multiplicidade de infecção de 0,001 PFU por célula a cada poço. Após ~24-78 horas, o meio do vírus extracelular de cada poço foi removido, centrifugado a 10 3.200 g por 5 minutos e titulado quanto ao vírus. Os resultados são providos na Tabela 1A.

15

Tabela 1A

Fármaco	Nível de Inibição	C <i>In Vitro</i>	C no Soro Alvo
Amantadina	EC25	0,054 µg/ml	0,288 µm
Amantadina	EC50	0,091 µg/ml	0,480 µm
Amantadina	EC75	0,153 µg/ml	0,815 µm
Oseltamivir	EC25	0,025 µg/ml	0,080 nM
Oseltamivir	EC50	0,050 µg/ml	0,160 nM
Oseltamivir	EC75	0,075 µg/ml	0,240 nM
Ribavirina	EC25	0,310 µg/ml	0,760 µM
Ribavirina	EC50	0,420 µg/ml	1,030 µM
Ribavirina	EC75	0,615 µg/ml	1,500 µM

As concentrações EC_{25} , EC_{50} e EC_{75} para cada fármaco foram testadas sozinhas e em todas as combinações duplas e triplas possíveis quanto a efeitos ativos e/ou sinérgicos sobre replicação viral em cultura de tecido, para um total de 64 condições testadas (isto é, nenhum fármaco, 9 20 tratamentos simples, 27 tratamentos de combinação e 27 tratamentos de combinação tripla). Resumidamente, as células MDCK foram cultivadas como monocamadas em frascos, os fármacos foram adicionados à cultura e as

células foram infectadas através da introdução de vírus A/Albany em uma multiplicidade de infecção (MOI), isto é, razão de partículas de vírus infeccioso para o número de células sendo infectadas, de 0,001 PFU por célula. A cultura foi mantida por ~48 horas ou até que o efeito citopático fosse evidente em monocamada. Após centrifugação, os sobrenadantes foram armazenados a -70°C como alíquotas de 3 x 500 µl para análise TCID₅₀, PFU e NA e 1 x 200 µl para QPCR.

Combinções de fármaco foram determinadas ser sinérgicas se a inibição real de replicação viral fosse maior do que a inibição calculada usando o *software* MacSynergy II conforme descrito por Prichard e outros (*Antimicrob. Agents Chemother.* (1993) 37:540-545). Sinergia forte foi vista com combinações duplas de amantadina com ribavirina e amantadina com oseltamivir em concentrações suficientemente baixas que vão resultar em menos efeitos colaterais adversos em seres humanos. Ainda, combinações triplas com amantadina em EC₂₅ e EC₅₀ demonstraram um efeito sinérgico forte em concentrações que minimizariam ou evitariam efeitos colaterais.

Exemplo 1B: Um estudo de resposta de dose da atividade antiviral de amantadina, oseltamivir e ribavirina em combinação em células MDCK infectadas com A/Sydney/05/97 H3N2

O objetivo do presente estudo era demonstrar que a combinação tripla de amantadina, oseltamivir e ribavirina reduz carga viral comparado com nenhum fármaco e exibe um efeito sinérgico comparado com monoterapia. Os métodos usados eram os mesmos que aqueles usados no Exemplo 1A, exceto onde mencionado abaixo.

Células MDCK foram cultivadas como monocamadas em placas de 96 poços e infectadas através da introdução de vírus A/Sydney/05/97 H3N2 em MOI de 0,01 PFU por célula. Os fármacos foram adicionados em cada uma das 216 combinações possíveis nas concentrações que seguem: amantadina a 0, 0,032, 0,1, 0,32, 1,0 e 3,2 µg/ml; oseltamivir a 0, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032 e 0,1 µg/ml; e ribavirina a 0, 0,032, 0,1, 0,32, 1,0 e 3,2 µg/ml.

O método analítico tridimensional descrito por Prichard e Shipman (1990), *supra*, e Prichard e outros (1993), *supra*, foi usado para visualizar os dados conforme mostrado na Figura 5, acima. Amantadina em combinação dupla com ribavirina e oseltamivir demonstrou sinergia, enquanto a
5 combinação dupla de oseltamivir com ribavirina não foi sinérgica. Sinergia foi vista nas faixas de concentração que seguem: amantadina a 0,1-1 µg/ml, ribavirina a 0,032-1,0 µg/ml e oseltamivir a 0,01-0,032 µg/ml. Essas concentrações correspondem a dosagens diárias humanas de aproximadamente 50-200 mg de amantadina, 200-600 mg de ribavirina e 2,5-25 mg de oselta-
10 mivir. Sinergia não foi demonstrada em concentrações de amantadina acima de 1 µg/ml devido ao limite do ensaio de detecção (isto é, houve uma inibição completa de carga viral).

O experimento demonstrou ainda as interações sinérgicas dos três fármacos quando usados em combinação. Sensibilidade do vírus a cada
15 fármaco quando usado em combinação tripla foi melhorada em 10 a 100 vezes comparado com cada fármaco usado como monoterapia. Por exemplo, monoterapia com amantadina em uma concentração de 1 µg/ml resultou em uma redução de aproximadamente 60% na carga viral, enquanto aproximadamente a mesma redução em carga viral foi alcançada com amantadina a
20 0,1 µg/ml em combinação com 0,01 µg/ml de oseltamivir e 0,32 µg/ml de ribavirina, demonstrando um aumento de 10 vezes em sensibilidade à amantadina. Monoterapia com oseltamivir em uma concentração de 0,1 µg/ml resultou em uma redução de aproximadamente 50% em carga viral, enquanto oseltamivir a 0,001 µg/ml em combinação com 0,32 µg/ml de amantadina e
25 0,32 mg/ml de ribavirina resultou em uma redução de aproximadamente 65% em carga viral, demonstrando um aumento de mais de 100 vezes em sensibilidade a oseltamivir. Monoterapia com ribavirina em concentrações de 1 µg/ml e 3,2 µg/ml resultou em reduções de aproximadamente 10% e 95% em carga viral, respectivamente, enquanto ribavirina a 0,032 µg/ml em com-
30 binação com 0,32 µg/ml de amantadina e 0,01 µg/ml de oseltamivir resultou em uma redução de aproximadamente 95% em carga viral, demonstrando um aumento de 100 vezes em sensibilidade a ribavirina.

Exemplo 1C: Estudo para Determinar a Eficácia de Monoterapia e Terapia de Combinação em um Ensaio Cinético *In Vitro*

O objetivo do presente estudo era avaliar a eficácia antiviral de amantadina, oseltamivir e ribavirina como agentes únicos e em combinação em um modelo cinético *in vitro* de infecção pelo vírus da Gripe A/Victoria/3/75 (H3N2). A eficácia foi avaliada através de redução da carga viral, conforme medido através de CCID50 e qPCR, e inibição de efeito citopático viral (CPE), conforme determinado através de inspeção visual. Um objetivo secundário foi determinar a dose infecciosa ótima e as faixas de dosagem apropriadas para cada fármaco como agentes únicos e a combinação.

Grupos de tratamento são mostrados na Tabela 1C. Cada grupo foi testado em duplicata e em ambas as cepas de célula MDCK e SIAT-1.

Tabela 1C: Elaboração do Estudo

Grupo ^a	Tratamento	Amantadina (µg/mL)	Oseltamivir (µg/mL)	Ribavirina (µ/mL)
Grupos de Tratamento de Agente Único				
1	Placebo	-		
2	Amantadina (0,15)	0,15		
3	Amantadina (0,5)	0,5		
4	Amantadina (1,5)	1,5		
5	Oseltamivir (0,0001)		0,0001	
6	Oseltamivir (0,001)		0,001	
7	Oseltamivir (0,01)		0,01	
8	Ribavirina (0,6)			0,6
9	Ribavirina (2,0)			2,0
10	Ribavirina (6,0)			6,0
Grupos de Tratamento de Combinação				
11	Combo (0,15/0,0001/0,6)	0,15	0,0001	0,6
12	Combo (0,5/0,001/2,0)	0,5	0,001	2,0
13	Combo (1,5/0,01/6,0)	1,5	0,01	6,0

^a Cada grupo foi testado em duplicata e em ambas as cepas de célula MDCK e SIAT-1.

Células MDCK e SIAT-1 foram semeadas em frascos T25 em

uma densidade de célula de 4×10^5 células/mL, em um total de 5 mL, em meio de crescimento. As células foram deixadas aderir aos frascos da noite para o dia e no dia seguinte os frascos foram inspecionados para verificar que as células eram ~70% confluentes. As células foram lavadas uma vez com 5 mL de meio de infecção com ou sem fármacos.

Em $T = 0$, os frascos foram infectados com A/Influenza/3/75 (H3N2), em uma dose infecciosa de $\sim 10^1$ CCID 50 ml. Após 2 horas, o meio foi removido e as células foram lavadas uma vez com 5 mL de meio de infecção com fármaco. O meio de lavagem foi descartado e 5 mL de meio de infecção fresco com fármaco foram adicionados.

Em 24 horas, os frascos foram removidos da incubadora e foram visualmente inspecionados quanto à CPE. CPE, uma indicação de viabilidade celular, foi quantitativamente avaliada através de classificação dos frascos em uma escala de 0 a 4, com 4 sendo a CPE máxima. A classificação é uma estimativa de % de viabilidade. Um frasco que está 100% morto é classificado um 4. Um frasco que está 75% morto é classificado em 3, 50% = 2, 25% = 1 e 0% = 0. O meio foi então completamente removido dos frascos e uma alíquota foi obtida e congelada para quantificação de carga viral subsequente através de análise CCID50. A monocamada celular foi lavada duas vezes com 5 mL de meio de infecção com ou sem fármacos e 5 mL de meio de infecção fresco com ou sem fármaco foram adicionados. Os frascos foram então retornados para a incubadora. Em $T = 48, 72, 96, 120, 144$ e 168 horas, o procedimento foi repetido. Avaliação de CPE foi realizada e amostras para quantificação de carga viral foram coletadas para cada regime em cada ponto de tempo.

Após o último ponto de tempo, todas as amostras de carga viral foram descongeladas e a carga viral para cada ponto de tempo foi determinada através de análise CCID50. Células MDCK foram semeadas em placas de 384 poços a 4×10^5 células por ml com um volume de 50 mL por poço. As células foram deixadas aderir da noite para o dia. 50 μ l de vírus serialmente diluído foram então adicionados à placa e as placas foram retornadas para a incubadora. As placas foram removidas da incubadora nos Dias 3 e 6

e visualmente classificadas quanto à CPE. Após 6 dias, as placas foram congeladas a -80°C em preparação para sequenciamento Sanger.

CCID50, definido como a dose na qual 50% de poço estão infectadas, é calculada usando o cálculo Karber (Karber, 1931), dada a equação:
5 $\log \text{CCID50} = L - d(S-0,5)$, onde: L = log da menor diluição usada no teste; d = diferença entre etapas de diluição log; e S = soma de proporção de testes "positivos" (isto é, culturas mostrando CPE).

Na ausência de fármacos, os braços de placebo produziram um título viral de pico em 48 horas pós-infecção em ambas as cepas de célula
10 SIAT-1 e MDCK. Títulos virais de pico foram similares para ambas as cepas de célula SITA-1 e MDCK, com as células SIAT-1 produzindo $6,75 \log_{10}$ de CCID50/0,05 mL em um período de 24 horas medido em 48 horas pós-infecção e as células MDCK produzindo $6,25 \log_{10}$ de CCID50/0,05 mL. O vírus parecia replicar mais rápido em células SIAT do que MDCK; em 24 ho-
15 ras pós-infecção, o título viral era $4 \log_{10}$ de CCID50/0,05 mL de células SIAT e $2,25 \log_{10}$ de CCID50/0,05 mL de MDCK. Após atingir o pico, produção de vírus caiu em ambas as cepas de célula. Presumivelmente, a queda no título viral é devido a todas as células terem sido infectadas e mortas pela infecção.

20 Houve uma boa correlação entre carga viral e viabilidade celular, com todas as células morrendo concomitantemente com o título viral de pico ou um pouco depois. Por exemplo, para células SIAT a carga viral de pico para o grupo de placebo aconteceu em 48 horas e morte celular completa (0% de viabilidade celular) aconteceu em 48 horas; para células MDCK a
25 carga viral de pico aconteceu em 48 horas e morte celular completa aconteceu em 72 horas.

Tratamento com os fármacos como agentes únicos deu uma inibição dependente da dose de carga viral em 24 horas em ambas as células SIAT e MDCK. No ponto de tempo de 24 horas, cada fármaco como um a-
30 gente único na dose alta reduziu a carga viral em 3-4 logs comparado com o grupo placebo em células SIAT e em 2 logs em células MDCK. Para todos os três fármacos como agentes únicos, a inibição vista no ponto de tempo de

24 horas não foi prolongada, e título viral alto pode ser detectado em pontos de tempo posteriores. Então, nenhum dos regimes de tratamento de agente único foi bem-sucedido em inibir completamente a replicação de vírus, embora em todos os casos tratamento com agente único tenha retardado o pico de produção viral em 24 a 48 horas comparado com placebo.

Dados de viabilidade celular para os regimes de agente único estavam de acordo com os dados de carga viral: tratamento com agente único foi capaz de retardar, mas não inibir, a mortalidade celular. Em células SIAT, todos os grupos de agente único tinham mortalidade de célula completa em 72 horas, com a dose mais alta de cada fármaco retardando a morte de célula em 24 horas comparado com placebo. Em células MDCK, tratamento com agente único retardando a morte celular por um máximo de 48 a 72 horas comparado com placebo. Em termos de viabilidade celular, o melhor regime de agente único foi a dose de 0,5 µg/mL de amantadina, onde morte de célula substancial não foi vista até 144 horas pós-infecção.

Regimes de combinação também mostraram uma inibição dependente da dose de replicação viral. Em células SIAT, o grupo de combinação de dose baixa retardou a produção de vírus de pico em 24 horas comparado com placebo, e o grupo de combinação de dose média retardou a produção de vírus de pico em 48 horas. Em ambos os grupos, produção de vírus atingiu títulos relativamente altos de 6,1 e 4,9 log₁₀ de CCID₅₀/0,05 mL para as doses baixa e média, respectivamente, apesar da carga viral como uma função de tempo ter sido sinergisticamente reduzida em mais de 2 vezes em todos os momentos medidos. O grupo de combinação de dose alta, no entanto, inibiu completamente a produção de vírus para níveis não-detectáveis até o último ponto de tempo tomado em 168 horas pós-infecção. De acordo com a inibição completa de produção de vírus, as células no grupo de combinação de dose alta foram também completamente protegidas de morte celular até o último ponto de tempo medido em 168 horas pós-infecção. Dado o fato de que ambas as células SIAT e MDCK eram 100% viáveis sob este regime durante todo o curso do estudo, pode ser concluído que a combinação de todos os três fármacos na dose alta testada não foi

citotóxica, e que inibição de produção de vírus era devido a efeitos antivirais sinérgicos dos fármacos na combinação e não uma consequência artificial de citotoxicidade. As doses de combinação baixa e média retardaram a morte celular em 24 e 96 horas em células SIAT, respectivamente, e em 72 e 96 horas em células MDCK, respectivamente. Além disso, nessas taxas de replicação viral baixas, a combinação tripla suprime completamente a formação de resistência.

Então, combinações triplas podem levar a uma redução sinérgica na taxa de crescimento e resistência viral de gripe. Mais especificamente, ao usar um inibidor de M2 (por exemplo, amantadina), um inibidor de neuraminidase (por exemplo, oseltamivir, zanamivir) e um inibidor de replicação (por exemplo, ribavirina), há uma redução sinérgica de mais de 2 vezes na taxa de crescimento nas faixas de concentração de amantadina a 0,15-1,5 µg/ml, oseltamivir a 0,0001-0,01 µg/ml e ribavirina a 0,6-6 µg/ml.

15 Exemplo 2: Efeito de combinações triplas de amantadina, oseltamivir e ribavirina sobre gripe H3N2 do tipo selvagem no sistema de fibra oca

A requerente elaborou este experimento para testar o efeito de combinação tripla de amantadina, oseltamivir e ribavirina sobre replicação de vírus no modelo de fibra oca usando métodos previamente descritos (Drusano e outros, *Antimicrob. Agents Chemother* (2002) 46:464-470). Os fármacos, sozinhos ou em combinação, foram aplicados em concentrações de estado uniforme através de infusão contínua em estado uniforme por 168 horas. Resumidamente, 10^8 células MDCK foram cultivadas em fibras ocas e infectadas através da introdução de 10^2 células infectadas com vírus da gripe, aplicadas em meio de cultura celular em um sistema de fibra oca reservatório duplo. Uma cepa A/Albany (H3N2) do tipo selvagem foi testada. A cultura foi mantida por 168 horas. Em T = 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas pós-infecção, as amostras foram removidas da fibra oca e tituladas para determinar o título viral. No lado de fármaco da fibra oca, doze experimentos independentes foram conduzidos para testar as combinações e concentrações de fármaco mostradas na Tabela 2:

Tabela 2

Braço	Fármaco		
	Amantadina ($\mu\text{g/mL}$)	Oseltamivir (ng/mL)	Ribavirina ($\mu\text{g/mL}$)
1	0	0	0
2	0,1		
3	1,0		
4		1	
5		10	
6			0,5
7			5
8	0,1	1	0,5
9	0,1	10	5
10	1	1	0,5
11	1	10	0,5
12	1	10	5

As amostras foram removidas da fibra oca em vários pontos de tempo para determinar o número de vírus infecciosos. Os vírus de vários pontos de tempo foram também sequenciados através do método Sanger para determinar a sequência dos genes NA, HA e M2. Uma redução em variação de sequência com tratamento de combinação comparado com tratamento com fármacos sozinhos demonstra que combinações triplas inibem a geração de mutantes resistentes para qualquer um dos fármacos.

Amantadina sozinha teve efeito insignificante em dose baixa e uma redução 2-3 log em título em 48 horas em dose alta; oseltamivir sozinho teve redução ~1 log em ambas as doses; e ribavirina sozinho teve efeito insignificante em dose baixa e redução ~3 log em 48 horas em dose alta. A combinação de todos os três fármacos em doses baixas resultou em redução ~8 log em título em 48 horas, uma redução sinérgica 4 log em crescimento viral. A combinação de todos os três fármacos em doses altas resultou em uma inibição sinérgica e completa (isto é, > 8 logs) em todos os pontos de tempo. A combinação tripla então demonstrou sinergismo nas con-

centrações que seguem: amantadina a 0,1-1 µg, oseltamivir a 0,001-0,01 µg/ml e ribavirina a 0,5-5 µg/ml. Essas concentrações correspondem a dosagens diárias humanas de aproximadamente 50-700 mg de amantadina, 200-2500 mg de ribavirina e 2,5-10 mg de oseltamivir.

5 Ainda, os braços de monoterapia para amantadina e oseltamivir resultaram em formação apreciável de resistência a fármaco de M2 e NA, enquanto o braço de dose tripla não.

Exemplo 3A: Efeito de combinações triplas de amantadina, oseltamivir e ribavirina sobre tratamento de gripe em camundongos

10 A requerente elaborou este experimento para determinar os efeitos da combinação tripla de amantadina, oseltamivir e ribavirina em um modelo de camundongo de infecção de gripe.

 Camundongos fêmeas (17-18 g) foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) através de injeção intraperitoneal (i.p.). Bombas osmóticas Alzet contendo amantadina foram inseridas cirurgicamente através de via subcutânea nas costas de camundongos aproximadamente 12 horas antes da provocação com vírus. No momento da infecção, os camundongos foram novamente anestesiados com cetamina. Eles foram infectados intranasalmente (i.n.) com doses infecciosas de cultura de aproximadamente 2×10^4 células (CCID50) de vírus A/Victoria/3/75 (H3N2) por camundongo em um volume de inóculo de 90 µl. Os primeiros tratamentos orais (através de gavagem) com oseltamivir e ribavirina foram dados um pouco antes da infecção e então continuaram uma vez por semana por 7 dias consecutivos (em 12 horas de intervalo). Havia 20 animais tratados com placebo que receberam água através de gavagem oral e inicialmente 12 camundongos por grupo tratados com fármaco. Os camundongos foram mantidos 21 dias para observar quanto à morte e foram pesados como um grupo dia sim, dia não.

25 Amantadina foi administrada através de Bomba Alzet em 3 mg/ml ou 10 mg/ml, para aplicar 4 mg/kg/dia ou 13 mg/kg/dia, respectivamente; oseltamivir foi administrado a 30 mg/kg/dia ou 10 mg/kg/dia através de gavagem oral; e ribavirina foi administrado a 7 mg/kg/dia ou 21 mg/kg/dia através de gavagem oral. Os fármacos foram administrados como monote-

rapia e nas seis combinações triplas possíveis.

Todos os tratamentos de monoterapia foram altamente eficazes contra a infecção em prevenção de morte exceto pela amantadina a 3 mg/ml e ribavirina a 7 mg/kg/dia. Os tempos para morte foram significamente aumentados nessas doses, e a taxa de sobrevivência de 27% (3 sobreviventes de 11) com 3 mg/ml de amantadina foi significamente diferente do controle de placebo.

Todas as terapias de combinação preveniram mortalidade em 90-100%. Isto não foi inesperado, com base no fato de que monoterapia de oseltamivir sozinha proveu um benefício de sobrevivência de 92-100% em 10 e 30 mg/kg/dia, e oseltamivir nessas doses eficazes foi um componente de todas as combinações. A dose de 10 mg/ml de amantadina era da mesma maneira 92% protetora, então combinações com este agente seriam da mesma maneira altamente protetoras.

Amantadina a 3 mg/ml e ribavirina a 7 mg/kg/dia tinham o suficiente de morte de camundongos nesses grupos para mostrar retardos em morte que diferiam do controle de placebo. A(s) outra(s) dose(s) de cada composto eram altamente protetoras. Os compostos usados em combinação mostraram padrões de morte similares às duas doses de oseltamivir ou à dose de 10 mg/ml de amantadina.

O fato de que todos os três regimes de combinação tripla eram iguais a ou melhores do que todos os regimes de monoterapia sugeriu que esses fármacos não eram antagonísticos em combinação nas doses testadas. Se houvesse antagonismo significativo entre qualquer um desses três fármacos, seria esperado que a combinação tripla resultasse em eficácia menor do que monoterapia.

No geral, os dados de sobrevivência não foram úteis na avaliação do benefício alcançado pelo uso dos fármacos em combinação. No entanto, dados de peso do corpo provaram ser úteis em avaliação do benefício dos compostos em combinação. A infecção causou quedas severas no peso do corpo no grupo de placebo. Perda de peso durante a infecção foi mínima no grupo de 10 mg/ml de amantadina, mas perda de peso foi mais substan-

cial nos outros cinco grupos de monoterapia (isto é, amantadina a 3 mg/ml, oseltamivir a 10 ou 30 mg/kg/dia e ribavirina a 7 ou 21 mg/kg/dia). Usando os critérios de mortalidade UK/EU para estudos de animal (morte = perda de peso de 20%), foi constatado pela requerente que 10 mg/kg/dia de oseltamivir protegeram 40% dos camundongos, amantadina a 3 mg/ml protegeu 10% e ribavirina a 7 mg/kg/dia protegeu 0%. Quando usados como uma combinação tripla nas mesmas concentrações de fármaco, 100% dos camundongos foram protegidos. Devido ao fato de que amantadina a 10 mg/ml era altamente protetora como uma monoterapia, não houve uma grande diferença em peso entre a monoterapia comparado com as combinações, mas havia ainda uma diferença que favoreceu a combinação como sendo superior. Formação de resistência nos braços triplos foi muito menor do que registrado nos braços de monoterapia (0 vs. 2%).

Esses resultados demonstraram que combinação tripla contendo amantadina, oseltamivir e ribavirina foi eficaz na provisão de benefícios ambos a eficácia e a resistência para camundongos infectados com um vírus da gripe (H3N2).

Exemplo 3B: Efeito de combinações triplas de amantadina, oseltamivir e ribavirina sobre tratamento de gripe em camundongos

O experimento acima foi repetido exceto que o início do tratamento não começou até 24 ou 48 horas após os camundongos terem sido infectados com o vírus, e as concentrações de fármaco que seguem foram usadas: amantadina a 28 mg/kg/dia, oseltamivir a 10 mg/kg/dia e ribavirina a 40 mg/kg/dia.

No estudo onde tratamento foi iniciado 24 horas após a infecção, por volta do dia 9 pós-infecção ambos os grupos de monoterapia de amantadina e monoterapia de oseltamivir tinham 100% de mortalidade (usando os critérios de mortalidade UK/EU); o grupo de monoterapia de ribavirina tinha 20% de sobrevivência; e o grupo de terapia de combinação tripla tinha 90% de sobrevivência.

No estudo onde tratamento foi iniciado 48 horas após infecção, por volta do dia 9 todos os grupos tinham mais do que 20% de perda de pe-

so. No entanto, o grupo de terapia de combinação tripla tinha a quantidade mínima de perda de peso em aproximadamente 22%; o grupo de monoterapia de ribavirina tinha cerca de 26% de perda de peso; e os grupos de monoterapia de amantadina e monoterapia de oseltamivir tinham quase 35% de perda de peso cada um. Por volta do dia 13, todos os grupos de tratamento tinham começado a ganhar peso, mas o ganho de peso no grupo de terapia de combinação tripla foi significativamente maior – os animais neste grupo estavam aproximadamente 90% de seu peso original. Em comparação, os animais no grupo de monoterapia de ribavirina estavam aproximadamente 80% de seu peso original e os animais nos grupos de monoterapia de oseltamivir e de monoterapia de amantadina não se alimentaram melhor do que controles não-tratados (aproximadamente 65-70% de seu peso original).

Exemplo 4: Um estudo de resposta de dose da atividade antiviral de amantadina, oseltamivir e ribavirina em combinação com células MDCK infectadas com H5N1 cultivadas em frascos

A requerente elaborou este experimento para avaliar a atividade antiviral de resposta de dose de uma combinação de amantadina, oseltamivir e ribavirina na inibição de replicação viral de A/Indonésia/05/2005 (H5N1) e A/Vietnam/1204/2004 (H5N1) e a geração de mutantes resistentes a fármaco. Os objetivos do experimento são demonstrar uma redução em carga viral comparado com nenhum fármaco e efeito sinérgico de combinação comparado com monoterapia.

Células MDCK foram cultivadas como monocamadas em placas de 96 poços. Em $T = 0$, 150 μL de vírus a 10 TCID₅₀/mL são adicionados a células. Um pouco depois, 50 μL de fármaco, ou sozinho ou em combinação, são adicionados aos poços para dar as concentrações finais indicadas. Os fármacos são testados nas concentrações que seguem em monoterapia: amantadina 0,00032, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032, 0,1, 0,32, 1, 3,2, 10, 32 e 100 $\mu\text{g/ml}$; oseltamivir a 0,0001, 0,00032, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032, 0,1 e 0,32, 1,0, 3,2, 10, 32 $\mu\text{g/ml}$; e ribavirina a 0,00032, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032, 0,1, 0,32, 1, 3,2, 10, 32 e 100 $\mu\text{g/ml}$. Seis doses de cada fármaco são testadas na combinação: amantadina a 0, 0,01, 0,032, 0,1, 0,32 e 1,0 $\mu\text{g/ml}$;

oseltamivir a 0, 0,00032, 0,001, 0,0032, 0,01, 0,032 µg/ml; e ribavirina a 0, 0,0032, 0,1, 0,32 e 3,2 µg/ml.

Em T = 72 horas, 100 µL de sobrenadante de cada poço de amostras em duplicata são agrupados e congelados para análise TCID₅₀. A monocamada de célula restante é ensaiada quanto à viabilidade celular através de tingimento com MTS.

Exemplo 5: Um kit para liberação prolongada de cloridrato de amantadina, ribavirina e fosfato oseltamivir

Com referência à Figura 1A, uma embalagem *blister* (10) de acordo com a presente invenção é preparada para prover uma pluralidade de fileiras (12), cada fileira (12) compreendendo uma pluralidade de doses (14). No presente exemplo, há duas de tais fileiras (12), cada fileira compreendendo sete doses, embora o número de fileiras ou doses possa ser variado conforme conveniente.

Cada dose compreende uma pluralidade de tipos diferentes de forma de dosagem, que são agrupadas juntas por tipo em *blisters* separados (20) dentro de cada fileira para formar subfileiras (18). Um primeiro tipo de forma de dosagem (A) contém amantadina, um segundo tipo (B) contém ribavirina e um terceiro tipo (C) contém oseltamivir. Os tipos diferentes de formas de dosagem para uma dada dose são agrupados juntos desta maneira para facilitar adesão a um regime de dosagem prescrito. Neste exemplo, uma dose única compreende duas cápsulas de amantadina (A), duas cápsulas de ribavirina (B) e uma cápsula de oseltamivir (C), embora o número de formas de dosagem de cada tipo para cada dose possa também variar conforme necessário. A embalagem *blister* mostrada na Figura 1A é configurada para dosagem BID conveniente de cada um dos agentes ativos durante um período de sete dias. A embalagem *blister* mostrada na Figura 1B é a mesma que aquela mostrada na Figura 1A exceto que o oseltamivir é dosado QD.

As cápsulas de amantadina (A) deste exemplo contêm cada uma 125 mg de cloridrato de amantadina em uma forma de liberação prolongada (por exemplo, conforme preparado de acordo com USSN 11/285.905) e são

dispostas em cada um dos *blisters* (20) das primeira e quarta subfileiras (18), embora cada cápsula possa conter mais ou menos amantadina ou uma forma de sal diferente de amantadina conforme desejado.

5 As cápsulas de ribavirina (B) deste exemplo contêm cada uma 200 mg de ribavirina em uma forma de liberação imediata, por exemplo, Cápsulas USP de Ribavirina (Schering), e são dispostas em cada um dos *blisters* (20) das segunda e quinta subfileiras (18), embora cada cápsula possa conter mais ou menos ribavirina conforme desejado.

10 As cápsulas de oseltamivir (C) deste exemplo contêm cada uma 75 mg de oseltamivir, por exemplo, TAMIFLU[®] (Roche Pharmaceuticals) e são dispostas em cada um dos *blisters* (20) das terceira e sexta subfileiras (18), embora cada cápsula possa conter mais ou menos oseltamivir conforme desejado.

15 A embalagem *blister* também compreende instruções indicando uma dosagem para adulto típica de duas cápsulas de amantadina, duas cápsulas de ribavirina e uma cápsula de oseltamivir duas vezes por dia. Será compreendido que a embalagem *blister* deste exemplo contém formas de dosagem suficientes para uma semana de dosagem, compreendendo 28 cápsulas contendo 125 mg de cloridrato de amantadina, 28 cápsulas con-

20 tendo 200 mg de ribavirina e 14 cápsulas contendo 75 mg de fosfato de oseltamivir. Então, a porcentagem relativa de cada agente ativo por dose diária é 35% em peso de cloridrato de amantadina, 55% em peso de ribavirina e 10% em peso de fosfato de oseltamivir.

25 Exemplo 6: Um kit para cloridrato de amantadina, ribavirina e fosfato de oseltamivir

Uma embalagem *blister* similar à embalagem *blister* do Exemplo 5 é configurada para prover duas fileiras (12) de três subfileiras (18) de sete *blister* (20) por cavidade. Dois comprimidos ou cápsulas de 100 mg de cloridrato de amantadina (A) em uma forma de liberação imediata, por exemplo, Symmetrel[®] (Endo Pharmaceuticals ou Novartis) são embaladas em cada

30 um dos *blisters* (20) das primeira e quarta subfileiras (18). Duas cápsulas de 200 mg de ribavirina em uma forma de liberação imediata, por exemplo,

Cápsulas de Ribavirina USP (Schering) são embaladas em cada um dos *blisters* (20) das segunda e quinta subfileiras. Uma cápsula de 75 mg de oseltamivir, por exemplo, Tamiflu® (Roche Pharmaceuticals), é embalada em cada um dos *blisters* (20) das terceira e sexta subfileiras. A embalagem *blister* também compreende instruções indicando uma dosagem de adulto típica de dois comprimidos ou cápsulas de amantadina, duas cápsulas de ribavirina e uma cápsula de oseltamivir duas vezes por dia. A embalagem *blister* contém formas de dosagem suficientes para uma semana de dosagem.

10 Exemplo 7: Um kit de liberação prolongada de cloridrato de amantadina e ribavirina

Com referência à Figura 2, uma embalagem *blister* diferente (30) de acordo com a presente invenção compreende duas fileiras (32), cada uma de duas subfileiras (38) de sete *blisters* (40) por fileira para prover duas fileiras de sete doses (34) por fileira. Cada dose (34) compreende dois agentes ativos diferentes, amantadina (A) e ribavirina (B), contidos em tipos respectivos de forma de dosagem. Cada tipo de forma de dosagem para cada dose (34) é disposto em um *blister* separado (40). As formas de dosagem de amantadina (A) e ribavirina (B) para cada dose (34) são agrupadas juntas para facilitar adesão ao regime de dosagem.

Neste exemplo, cada dose (34) compreende duas cápsulas de amantadina (A) e duas cápsulas de ribavirina (B). Duas cápsulas (A) de 125 mg de cloridrato de amantadina em uma forma de liberação prolongada (preparada de acordo com USSN 11/285.905) e embaladas em cada um dos *blisters* (40) das primeira e terceira subfileiras (38). Duas cápsulas de 200 mg de ribavirina (B) em forma de liberação imediata, por exemplo, Cápsulas de Ribavirina USP (Schering) são embaladas em cada um dos *blisters* (40) das segunda e quarta subfileiras (38).

A embalagem *blister* (30) também compreende instruções indicando uma dosagem para adulto típica (30) de duas cápsulas de liberação prolongada de amantadina (A) e duas cápsulas de ribavirina (B) duas vezes por dia (BID). A embalagem *blister* contém formas de dosagem suficientes

para uma semana de dosagem. O kit pode ser usado em conjunto com um inibidor de neuraminidase separadamente embalado tal como oseltamivir ou zanamivir. Opcionalmente então, as ditas instruções podem incluir uma instrução adicional para co-administrar uma cápsula de 75 mg de oseltamivir, por exemplo, Tamiflu® (Roche Pharmaceuticals) (não mostrado) uma ou duas vezes por dia em conjunto com formas de dosagem de amantadina e ribavirina. Opcionalmente, o oseltamivir ou zanamivir é provido ao indivíduo separadamente do kit como um remédio adicionalmente prescrito.

5
10 Exemplo 8: Um kit para liberação prolongada de cloridrato de amantadina, ribavirina e oseltamivir

Com referência à Figura 3A, outro kit para administração de uma combinação de cloridrato de amantadina, ribavirina e oseltamivir compreende uma embalagem *blister* (50) que define duas fileiras (52) de *blisters*, cada fileira (52) compreendendo duas subfileiras (58) de sete *blisters* (60) cada um para definir sete doses (54) por fileira. As fileiras (52) servem para agrupar dois tipos diferentes de forma de dosagem (D, E) requeridos para cada dose (54). Cada dose (54) compreende uma pluralidade de cápsulas de um tipo (D) e uma cápsula de outro tipo (E).

20 No presente exemplo, há três cápsulas de um tipo (D) por dose, porém menos ou mais tais cápsulas podem ser usadas conforme necessário. As ditas cápsulas de um tipo (D) compreendem ribavirina e cloridrato de amantadina, onde o cloridrato de amantadina é provido em uma formulação de liberação prolongada e ribavirina é uma formulação de liberação imediata, as duas formulações sendo co-encapsuladas.

25 As cápsulas do outro tipo (E) compreendem oseltamivir e são agrupadas com as cápsulas de amantadina-ribavirina (D) para facilitar adesão às instruções prescritas. Mais de uma cápsula do outro tipo (E) por dose (54) pode ser usada se desejado. A embalagem *blister* (50) deste exemplo é então configurada para dosagem BID dos ingredientes ativos durante um período de sete dias. A embalagem *blister* mostrada na Figura 3B é a mesma que aquela mostrada na Figura 3A exceto que o oseltamivir é dosado QD.

Exemplo 9: Um kit para liberação prolongada de cloridrato de amantadina, ribavirina e oseltamivir

Uma embalagem *blister* diferente (70) de acordo com a presente invenção é mostrada na Figura 4. A dita embalagem *blister* (70) define duas fileiras (72) de *blisters* (80) de uma maneira similar aos Exemplos 5-8 acima. Neste exemplo, no entanto, há duas subfileiras, cada fileira compreendendo uma linha única de sete *blisters* (80), cada um dos *blister* acomoda uma pluralidade de formas de dosagem (F) todas do mesmo tipo, de modo que dentro de cada *blister* há formas de dosagem suficientes (F) para formar uma dose única (74). Cada fileira (72) então provê sete doses (74).

Cada forma de dosagem (F) neste exemplo compreende cloridrato de amantadina em uma forma de liberação prolongada, ribavirina e opcionalmente oseltamivir.

A embalagem *blister* (70) é então configurada para dosagem BID de cada um dos agentes ativos durante um período de sete dias. Tal kit poderia ser usado sozinho, especialmente onde a forma de dosagem compreende amantadina, ribavirina e oseltamivir, ou em conjunto com um inibidor de neuraminidase separadamente embalado, por exemplo, oseltamivir.

Exemplo 10: Estudo de segurança de dose múltipla em pacientes com gripe com uma combinação de amantadina ER, oseltamivir ER e ribavirina IR

A requerente elaborou o estudo clínico descrito na Tabela 4 para determinar a segurança e farmacocinética de uma formulação de combinação de liberação prolongada de amantadina e oseltamivir co-administrada com ribavirina IR.

Tabela 4

Propósito	Determinar a segurança e farmacocinética de doses repetidas de fármaco.
Dosagem:	A dosagem selecionada é baseada em estudo de dose ascendente única anterior (SAD): por exemplo, 100 mg de amantadina SR + 75 mg de oseltamivir + 400 mg de ribavirina, 100 mg de amantadina SR + 75 mg de oseltamivir + 600 mg de ribavirina, 200 mg de amantadina SR + 75 mg de oseltamivir + 400 mg de

Propósito	Determinar a segurança e farmacocinética de doses repetidas de fármaco.
	ribavirina, 200 mg de amantadina SR + 75 mg de oseltamivir + 600 mg de ribavirina, 200 mg de amantadina SR + 150 mg de oseltamivir + 600 mg de ribavirina ou 200 mg de amantadina SR + 150 mg de oseltamivir + 800 mg de ribavirina, QD por 7 dias
Controles Concomitantes:	Amantadina IR ou amantadina IR mais oseltamivir IR (ambas dosadas conforme os rótulos dos fabricantes)
Via:	Oral
População de indivíduo:	Machos ou fêmeas diagnosticados com gripe
Estrutura:	4 braços
Sítios de Estudo:	TBD
Teste cego:	Pacientes cegos
Método de Indicação de Indivíduo:	Aleatório com número igual de machos e fêmeas em cada grupo e distribuição de idade igual dentro dos grupos
Tamanho da Amostra Total:	24 indivíduos 6 por braço de dosagem
Ponto Final de Eficácia Primária:	Nenhum
Eventos Adversos:	Monitorados pelo menos duas vezes por dia quanto a efeitos comportamentais, cardiovasculares e gastrointestinais relatados para doses altas de amantadina ou oseltamivir (incluindo tontura, cefaléias, confusão, constipação, hipertensão, tosse, náusea, diarreia, vômito)
Coleta de Sangue:	Através de cânula durante o primeiro dia do período de estudo então 2-4 vezes por dia durante o resto do estudo
Análise:	Ensaio para medir amantadina, oseltamivir, ribavirina e potencialmente outros parâmetros fisiológicos, e eventos adversos

Exemplo 11: Teste Clínico de Fase 2 da Segurança e Eficácia de Terapia de Fármaco Antiviral de Combinação Tripla Intravenosa para o Tratamento de Gripe Aviária Grave

A requerente elaborou este estudo para: 1) avaliar a segurança e tolerabilidade de terapia de fármaco antiviral de combinação tripla i.v. (TCAD) no tratamento de pacientes com gripe aviária grave; 2) avaliar a taxa e extensão de eficácia antiviral de TCAD durante o curso do tratamento conforme avaliado através de detecção por transcriptase reversa-reação em cadeia de polimerase (RT-PCR) de ácido ribonucleico viral (RNA) em tratos respiratórios superior e inferior, trato gastrointestinal (fezes) e sangue (viremia), nariz e garganta; e 3) avaliar a taxa e extensão de resistência a fármaco antiviral para TCAD durante o curso de tratamento através de pirosequenciamento (ou equivalente).

Tamanho do Estudo: 12 pacientes

Crítérios de Inclusão: 1) idade ≥ 1 ano; 2) febre $\geq 38,0^{\circ}$ C; 3) pelo menos um sintoma respiratório: tosse, dispneia (respiração curta) e/ou dor de garganta; 4) enfermidade (início de febre, sintomas respiratórios ou sintomas constitucionais) começaram nos últimos 7 dias; e 5) têm evidência de risco epidemiológico para gripe aviária conforme definido ao satisfazer um dos critérios dentro de 14 dias antes do momento de início da doença: (a) Houve aves mortas ou doentes dentro da vila ou vizinhança dos indivíduos (dentro de um raio de 2 km); (b) o indivíduo teve contato direto com ave ou galinha (aves ou galinhas saudáveis ou doentes); (c) o indivíduo teve contato face a face com alguém declarado ou suspeito de ter gripe aviária; ou (d) o indivíduo teve possível exposição em laboratório ao vírus H5N1.

Crítérios de Exclusão: 1) História de alergia ou intolerância grave (conforme julgado pelo investigador) a cloridrato de amantadina, zanamivir e/ou ribavirina e/ou a quaisquer componentes desses produtos de fármaco; e 2) Explicação alternativa para os sintomas clínicos do paciente (isto é, outro que não gripe) conforme determinado pelo investigador com informação imediatamente disponível.

Crítérios de Varredura: 1) As amostras que seguem serão testa-

das através de RT-PCR qualitativa por 5 horas, no entanto, a decisão de iniciar terapia TCAD não é dependendo do recebimento dos resultados desses testes: esfregaço nasal x 2; esfregaço orofaríngeo (garganta) x 2; aspirado nasofaríngeo (NPA; como o NPA é um teste obstrutivo para alguns indivíduos, o NPA pode ser omitido ou uma lavagem nasal pode substituir o NPA a critério do investigador); lavagem alveolar bronquial (BAL) ou aspirado de tubo endotraqueal; amostra de sangue (para viremia, CBC e química de soro); e gravidez na urina para fêmeas \geq a 12 anos de idade.

Regime de dosagem de TCAD: A duração de tratamento será um mínimo de 5 dias, mas pode ser prolongada conforme determinado pelo médico com base em avaliação de benefício/risco para cada paciente individual. Um kit para 5 dias de tratamento contém: 1) 10 frascos contendo ~4 ml de 100 mg/ml de amantadina em água com ou sem tampão, 2) 10 frascos contendo 15 ml de 75 mg/ml de ribavirina em água com ou sem tampão e 3) 10 frascos de ~7 ml de 10 mg/ml de zanamivir em água com ou sem tampão ou, como uma alternativa para zanamivir, 10 frascos de oseltamivir liofilizado.

Para tratamento, 3,3 ml de um frasco de amantadina são retirados com uma seringa e injetados em uma bolsa de infusão de 500 ml de 0,9% ou 5% de dextrose/0,45% de solução salina produzindo uma concentração de 0,66 mg/ml de amantadina; a taxa de volume de infusão é ajustada para 40 ml/min, o que resulta em uma taxa de dose de infusão de 26 mg/h (630 mg/dia). 13,5 ml de um frasco de ribavirina são retirados com uma seringa e injetados em uma bolsa de infusão de 500 ml de solução salina produzindo uma concentração de 2,03 mg/ml de ribavirina; a taxa de volume de infusão é ajustada para 40 ml/min, o que resulta em uma taxa de dose de infusão de 84,6 mg/hora (2030 mg/dia). 6,5 ml de zanamivir são retirados com uma seringa e injetados em uma bolsa de infusão de 500 ml de solução salina produzindo uma concentração de 0,13 mg/ml de zanamivir; a taxa de volume de infusão é ajustada para 40 ml/min, o que resulta em uma taxa de dose de infusão de 5,3 mg/hora (127 mg/dia). Alternativamente ao zanamivir, 5 ml de água são retirados com uma seringa e injetados em um frasco de

oseltamivir liofilizado para reconstituir o pó estéril produzindo uma concentração de 46 mg/ml de fosfato de oseltamivir; a taxa de volume de infusão é ajustada para 40 ml/min, o que resulta em uma taxa de dose de infusão de 18,4 mg/hora (442 mg/dia). Nessas taxas de infusão novas bolsas de cada agente antiviral precisam ser preparadas a cada 12 horas.

Segurança: Eventos adversos serão monitorados. A *NIH Division of AIDS Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse Events* (tabela de classificação DAIDS AE) será usada para avaliar a gravidade de um evento adverso.

Avaliações Clínicas: Avaliações clínicas incluem: mortalidade no hospital; taxa e extensão de falha clínica durante o curso do tratamento [falha clínica é definida como morte, taquipneia grave (taxa respiratória ≥ 30 para idades ≥ 12 anos, taxa ≥ 40 para idades 6 a 12 anos, taxa ≥ 45 para idades de 3 a 6 anos, taxa ≥ 50 para idades de 1 a 3 anos); dispneia grave (incapaz de falar frases inteiras ou uso de músculos respiratórios acessórios); saturação de oxigênio arterial $< 92\%$ em ar ambiente através do método transcutâneo; necessidade de ventilação mecânica ou admissão ICU; mortalidade em 28 dias para indivíduos; mortalidade de 180 dias para indivíduos; uso de ventilação mecânica em qualquer momento para os indivíduos; número de admissões ICU para indivíduos com gripe aviária; desenvolvimento de síndrome do desconforto respiratório aguda (ARDS) em qualquer momento para os indivíduos; duração de hospitalização para indivíduos; duração de sintomas conforme definido com o tempo para ausência de febre, nenhum sintoma ou sintomas mínimos, nenhuma necessidade de medicação de socorro e continuação de atividade normal.

Pontos Finais de Virologia: Avaliações virológicas incluem: taxa e extensão de carga viral e queda durante o curso de tratamento conforme avaliado através de RT-PCR para RNA viral em esfregaços do nariz e da garganta, sangue, amostras de NAL e BAL; taxa e extensão da emergência de resistência ao fármaco antiviral amantadina e zanamivir conforme determinado através de pirosequenciamento; e caracterização genética de variantes resistentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para o tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente humano, a dita composição compreendendo: 10-60 por cento em peso (% em peso) de amantadina e 30-80% em peso de ribavirina, em que
5 as porcentagens em peso são baseadas no peso total de agentes ativos na composição.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ainda 0,5-30% em peso de oseltamivir.
3. Composição de acordo com a reivindicação 1, em uma forma
10 de dosagem unitária para administração oral.
4. Composição de acordo com a reivindicação 3, compreendendo 25-125 mg de amantadina e 50-200 mg de ribavirina.
5. Composição de acordo com a reivindicação 3, compreendendo pelo menos 125 mg de amantadina em uma forma de liberação prolongada e menos do que 200 mg de ribavirina.
15
6. Composição de acordo com a reivindicação 5, em que a amantadina está em forma de liberação prolongada.
7. Composição de acordo com a reivindicação 1, em uma forma de pó liofilizado em um frasco.
- 20 8. Composição de acordo com a reivindicação 1, em uma forma de líquido estéril em um frasco.
9. Método para o tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente, o dito método compreendendo:
administração ao paciente de uma quantidade eficaz de uma combinação de primeiro, segundo e terceiro agentes antivirais compreendendo:
25 a) um inibidor de M2 selecionado do grupo consistindo em rimantadina e amantadina;
b) um inibidor de polimerase de RNA selecionado do grupo consistindo em ribavirina e viramidina; e
30 c) um inibidor de neuraminidase (NAi) selecionado do grupo consistindo em oseltamivir, carboxilato de oseltamivir, zanamivir e peramivir.
10. Método de acordo com a reivindicação 9, em que os primeiro

e segundo agentes antivirais são administrados em quantidades que aumentam a sensibilidade de um vírus da gripe ao terceiro agente antiviral da combinação em pelo menos 2 vezes a sensibilidade do vírus ao terceiro agente antiviral quando usado como monoterapia.

5 11. Método de acordo com a reivindicação 9, em que os agentes antivirais são administrados ao paciente através de um método selecionado do grupo consistindo em oralmente, parenteralmente, através de inalação e suas combinações.

10 12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é administrado com amantadina em uma quantidade para manter uma concentração no plasma entre 0,3 e 1,5 µg/ml por pelo menos 48 horas contínuas.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente é administrado com amantadina parenteralmente ou oralmente em uma quantidade de 200 a 500 mg/dia.

15 14. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o paciente é administrado oralmente com amantadina em forma de liberação prolongada.

15. Método de acordo com a reivindicação 9, em que o vírus da gripe é resistente à monoterapia com amantadina ou oseltamivir.

20 16. Kit para tratamento ou profilaxia de gripe em um paciente, o dito kit compreendendo amantadina e ribavirina.

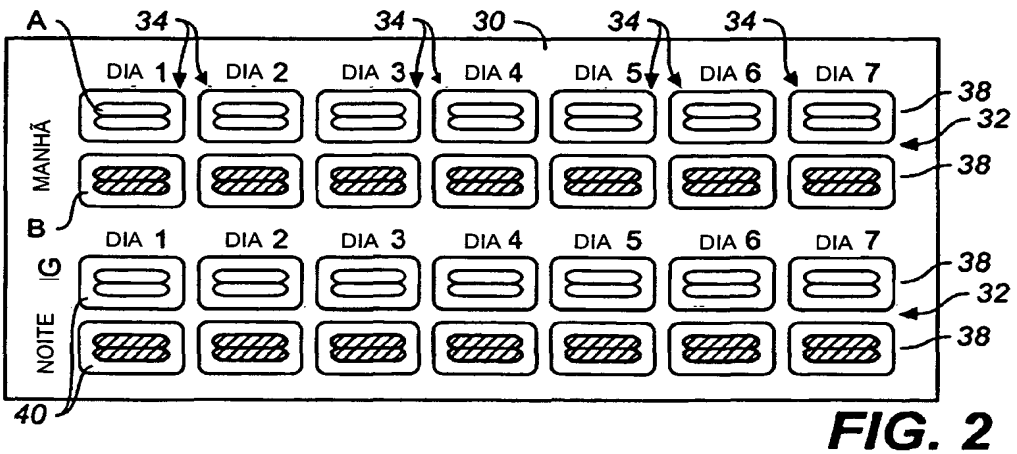
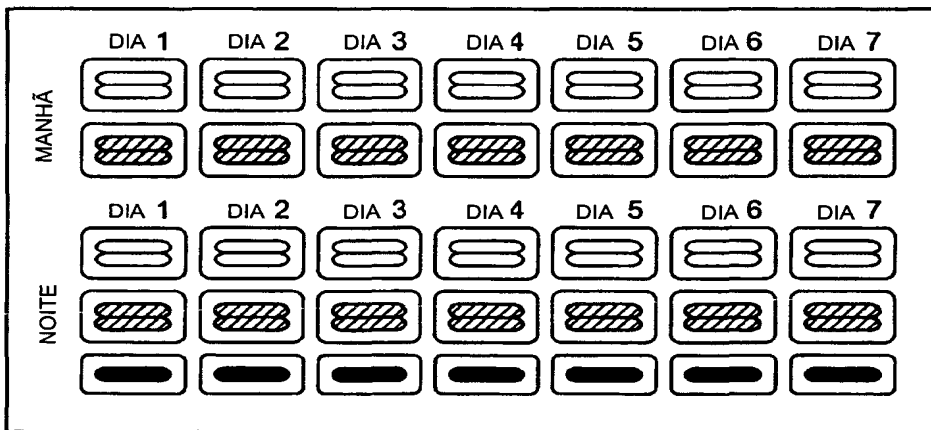
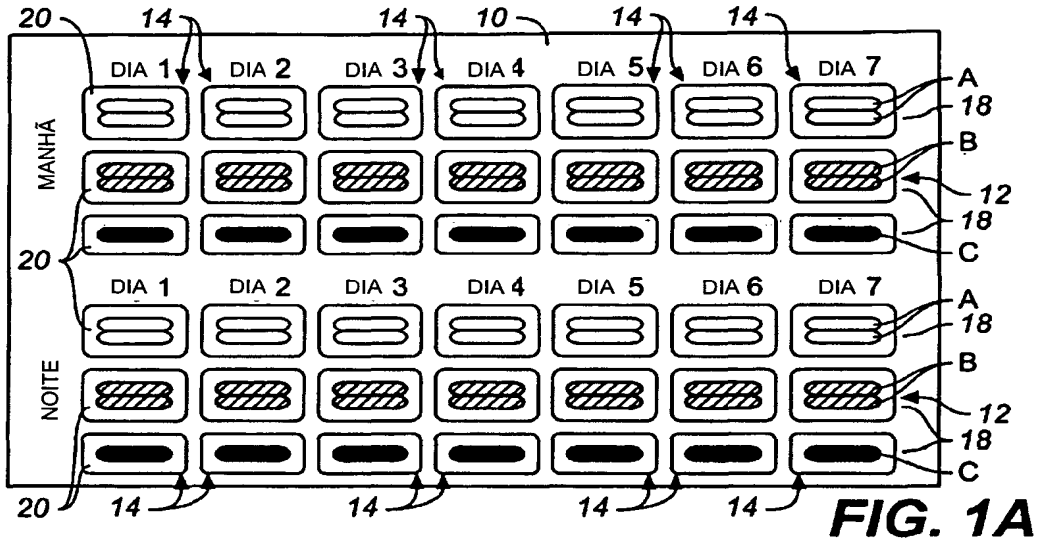
17. Kit de acordo com a reivindicação 16, para tratamento ou profilaxia oral, o dito kit compreendendo:

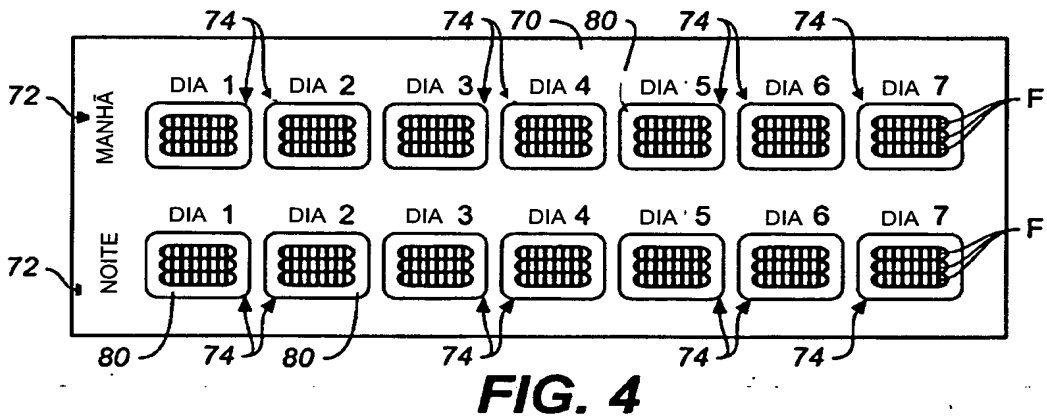
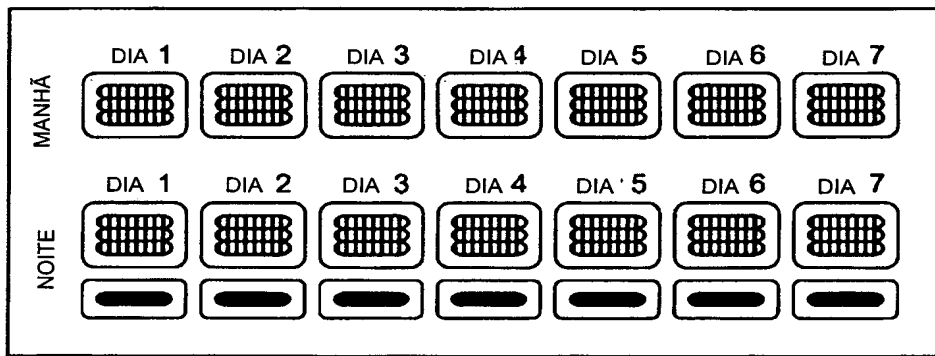
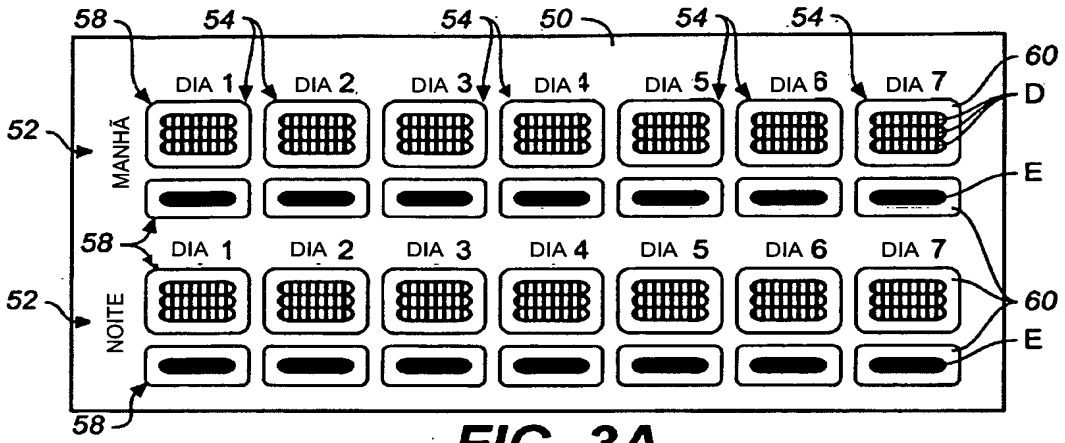
25 uma pluralidade de formas de dosagem, a dita pluralidade constituindo uma ou mais doses, cada dose compreendendo uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de uma combinação de ribavirina e amantadina.

18. Kit de acordo com a reivindicação 16, em que amantadina e ribavirina são formulados como formas de dosagem separadas.

30 19. Kit de acordo com a reivindicação 16, em que amantadina e ribavirina são co-formulados como formas de dosagem únicas.

20. Kit de acordo com a reivindicação 16, compreendendo ainda oseltamivir.





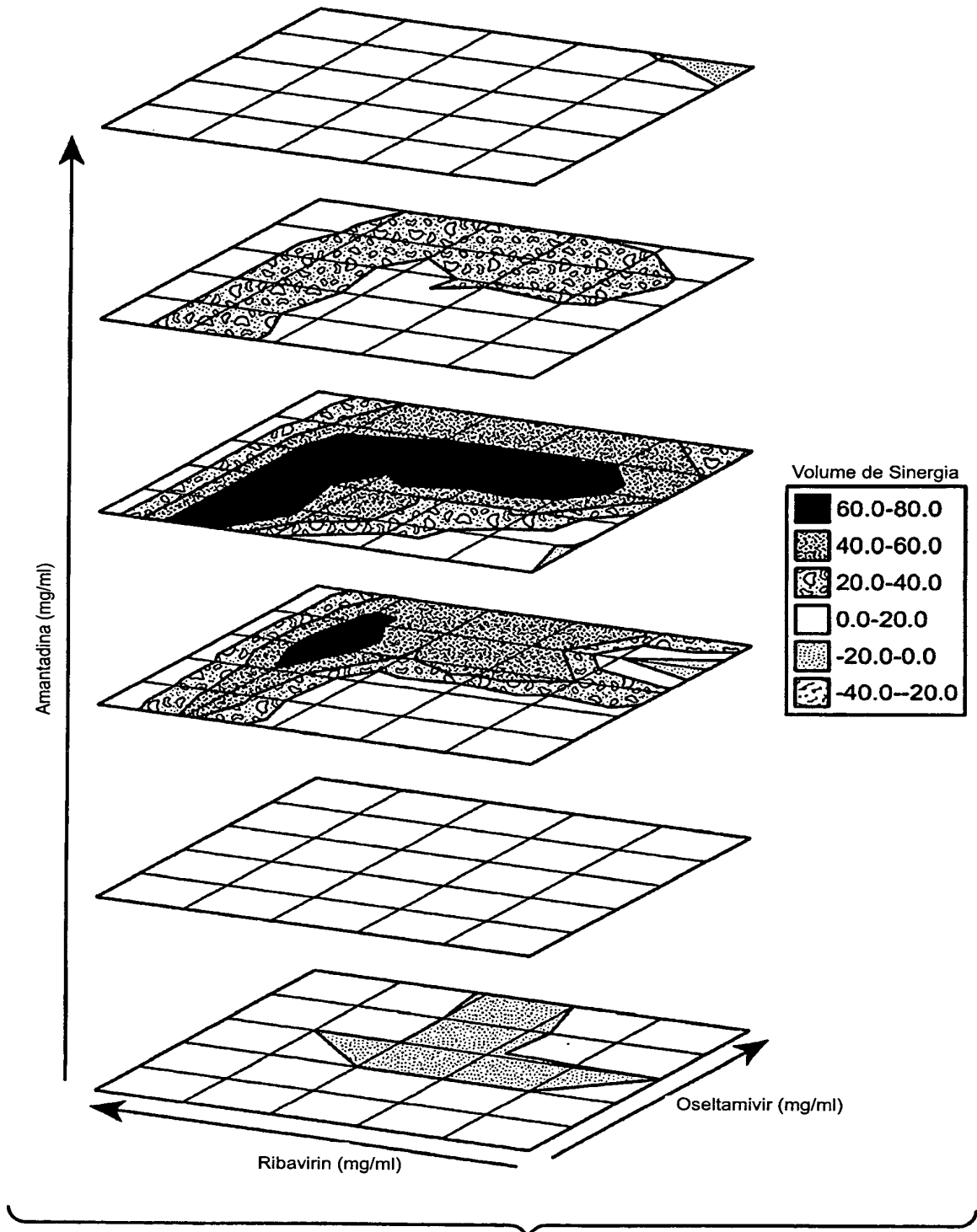


FIG. 5

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES E KITS PARA TRATAMENTO DE GRIPE**".

5 A presente invenção refere-se a composições, kits e métodos são providos para tratamento ou profilaxia de gripe.