



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 245 248**

② Número de solicitud: 200401396

⑤ Int. Cl.:

A61K 31/335 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 36/282 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **09.06.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2005**

Fecha de la concesión: **10.01.2007**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2007**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

⑰ Titular/es: **Universidad de Salamanca
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca, ES**

⑱ Inventor/es: **Rodríguez Romero, Marta;
Serrano García, María Ángeles;
Vallejo, Marta;
Efferth, Thomas Alfons y
García Marín, José Juan**

⑳ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

② TÍTULO: **Uso de la artemisinina y sus derivados en la fabricación de medicamentos útiles como agentes antivíricos.**

③ Resumen:

Uso de la artemisinina y sus derivados en la fabricación de medicamentos útiles como agentes antivíricos.

La invención muestra en sendos modelos de cultivos celulares *in vitro*, el efecto antivírico de la artemisinina, un compuesto obtenido de fuentes naturales y presente en preparados a base de plantas de la medicina tradicional china (MTC), así como de sus derivados, frente a los virus causantes de la hepatitis B (HBV), de la hepatitis C (HCV) así como frente al virus causante de la diarrea vírica bovina (BVDV). Los experimentos llevados a cabo demuestran el interés farmacológico de este principio activo en base al mencionado efecto antivírico, pero también, en base a su nula toxicidad para las células hospedadoras del virus y a su aceptable solubilidad.

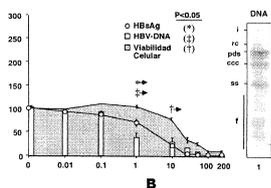
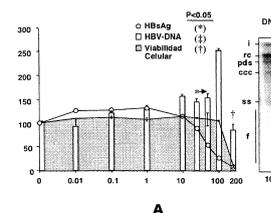


FIG. 1

ES 2 245 248 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Uso de la artemisinina y sus derivados en la fabricación de medicamentos útiles como agentes antivíricos.

5 **Ambito de la invención**

La invención se adscribe al sector técnico de la farmacia, en concreto, al tratamiento de enfermedades de origen vírico, como son, en humanos, la hepatitis C y la hepatitis B y la diarrea vírica bovina en medicina veterinaria, mediante fármacos de origen natural, en concreto de plantas de uso en la medicina tradicional china (MTC), como es el caso de la artemisinina y sus derivados.

Estado de la técnica

Gran parte de las infecciones víricas que afectan al hombre o a los animales son un importante problema sanitario a nivel mundial. En el caso de hepatitis B en humanos, por ejemplo, existe una vacuna segura y eficaz frente al hepadnavirus causante, el HBV, pero la infección sigue suponiendo un serio problema, que afecta a 300 millones de personas en todo el mundo, porque todavía no se ha desarrollado por completo ninguna terapia antivírica efectiva para tratar a los pacientes infectados por el virus.

En lo que se refiere a la hepatitis C, también en humanos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que aproximadamente 3% de la población mundial ha sido infectada por el agente que la causa, el HCV. Este hecho, unido en parte a la ausencia de una vacuna eficaz contra el flavivirus causante y a la severidad de la enfermedad hepática originada por el patógeno humano, convierte al HCV en una de las causas principales de enfermedades en el mundo. Además, el estudio de la biología del HCV así como el análisis sistemático de nuevos fármacos anti-HCV se ha visto obstaculizado hasta ahora por la carencia de un sistema eficaz de cultivo celular en el que propagar el virus. Por todo ello, existe una necesidad de encontrar fármacos con efectos antivíricos útiles para luchar contra los agentes causantes de estas dos infecciones hepáticas, la hepatitis B y la hepatitis C.

Igualmente ocurre con la diarrea vírica bovina, causada por un virus de la misma familia (*Flaviviridae*) que el HCV de los humanos, que produce una enfermedad que causa enormes pérdidas en las cabañas de ganado vacuno, que están obligando a los diferentes países que sufren periódicamente estas epidemias en su ganado, a poner en marcha costosos programas de erradicación de la enfermedad.

La búsqueda de nuevos fármacos para la medicina occidental llevó, hace ya varias décadas, a intentar hallarlos entre los remedios utilizados en la medicina tradicional china (MTC). La vasta experiencia de la MTC acumulada a lo largo de milenios ha seleccionado varios métodos curativos, que incluyen terapias basadas en el uso de plantas. Se han registrado aproximadamente 100.000 tratamientos con múltiples especies vegetales, pero la mayor parte de ellos están basados en mezclas de varias de ellas, lo que hace muy difícil la identificación de las sustancias activas responsables en realidad del efecto curativo. Aún así, se ha realizado un esfuerzo importante por identificar nuevos fármacos y aplicaciones a partir de productos naturales potencialmente útiles empleados habitualmente en la MTC, con vistas a desarrollar tratamientos normalizados para diferentes enfermedades humanas (Seeff *et al.*, 2001; Chang 1997; Chang 1998; Efferth *et al.*, 2003a). Algunos de ellos tienen ya usos terapéuticos conocidos en la medicina occidental. Es el caso de la artemisinina.

La artemisinina es una sustancia que se extrae de *Artemisia annua*, planta que ha sido utilizada durante milenios en la MTC como remedio contra los resfriados y la fiebre, y que es conocida en la medicina occidental por sus propiedades antimalaria (Nosten y Price, 1995; Meshnick, 2002). Un derivado de la artemisinina es el artesunato, para el que se ha descrito un efecto viroestático frente al citomegalovirus (Efferth *et al.*, 2002a) y citostático frente a células cancerosas (Efferth *et al.*, 2001; Efferth *et al.*, 2002b; Efferth *et al.*, 2002c; Efferth *et al.*, 2003b). El tratamiento farmacológico frente a distintos virus presenta una amplia gama de especificidades y solapamientos. Sorprendentemente, el hecho de que un compuesto sea efectivo contra un virus no determina en absoluto su eficacia frente a otro tipo de virus. De no ser así, el SIDA o la hepatitis vírica podrían combatirse eficazmente con agentes contra otros virus como el de la gripe. Por el contrario, tampoco es extraño que virus muy diferentes como el HBV y el HCV presenten sensibilidad cruzada a ciertos compuestos como la artemisinina, aunque no para otros como los que actualmente se usan en clínica. (De Clercq E. : 2004).

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que la artemisinina y sus derivados presentan también propiedades antivíricas frente a otros virus distintos a los citomegalovirus, en concreto frente a virus de las familias de hepadnavirus y flavivirus. La presente invención pone de manifiesto este efecto antivírico en experimentos *in vitro*, entre otros, con células hepáticas humanas. Concretamente, en el caso de la hepatitis B, se emplearon células HepG2 2.2.15, una línea celular derivada de células de hepatoblastoma humano (HepG2) infectadas de forma estable por el HBV (Sells *et al.*, 1987), como modelo *in vitro* para evaluar la capacidad antivírica de la artemisinina y de uno de sus derivados, el artesunato aumentando así su hidrosolubilidad, manifestando ambos compuestos capacidad antivírica, mientras que su toxicidad sobre las células hospedadoras sólo aparece a concentraciones muy superiores a las que llevan a cabo su efecto antivírico, junto con una aceptable solubilidad en los medios utilizados. En cuanto a la hepatitis C, las pruebas realizadas con la artemisinina demostraron un aumento de la viabilidad (protección frente al efecto citotóxico vírico) de células previamente infectadas con el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV, el modelo *in vitro* aceptado para

realizar estudios sobre el HCV), apoyando la idea de una posible futura utilización de este compuesto en la terapia contra el HCV.

La presente invención pone de manifiesto el efecto antivírico en experimentos *in vitro*, que incluyen células hepáticas humanas, de uno de los integrantes de las composiciones de plantas de la MTC, la artemisinina y de sus derivados. El efecto virostático frente a HBV, HCV y BVDV, se presenta a dosis a las que no existe toxicidad para las células hospedadoras y para las que los compuestos tienen buena hidrosolubilidad, en contraposición con la ausencia de dicho efecto antivírico y/o presencia de toxicidad para las células hospedadoras y/o mala solubilidad, presente en otros componentes de plantas también utilizadas en la MTC.

Bibliografía

Seeff LB, Lindsay KL, Bacon BR, Kresina TF, Hoofnagle JH (2001). Complementary and alternative medicine in chronic liver disease. *Hepatology* 34:595-603.

Chang IM (1997) Antiviral activity of aucubin against hepatitis B virus replication. *Phytotherapy Research* 11: 189-192.

Chang IM (1998) Liver-protective activities of aucubin derived from traditional oriental medicine. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 102:189-204.

Efferth T, Sauerbrey A, Halatsch ME, Ross DD, Gebhart E (2003a) Molecular modes of action of cephalotaxine and homoharringtonine from the coniferous tree *Cephalotaxus hainanensis* in human tumor cell lines. Naunyn-Schmiedeberg's. *Archives of Pharmacology* 367:56-67.

Nosten F, Price RN (1995) New Antimalarials. A risk-benefit analysis. *Drug Safety* 12:264-273.

Meshnick SR (2002) Artemisinin: mechanism of action, resistance and toxicity. *International Journal of Parasitology* 32: 1655-1660.

Efferth T, Marschall M, Wang X, Huong SM, Hauber I, Olbrich A, Kronschnabl M, Stamminger T, Huang ES (2002a) Antiviral activity of artesunate towards wild-type, recombinant, and gancyclovir-resistant human cytomegaloviruses. *Journal of Molecular Medicine* 80:233-242.

Efferth T, Dunstan H, Saurbrey A, Miyachi H, Chitambar C (2001) The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *International Journal of Oncology* 18 :767- 773.

Efferth T, Davey M, Olbrich A, Rucker G, Gebhart E, Davey R (2002b). Activity of drugs from Traditional Chinese Medicine toward sensitive and MDR-or MRP 1-overexpressing Multidrug-Resistant Human CCRF-CEM leukemia cells. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 28: 160-168.

Efferth T, Olbrich A, Bauer R (2002c) mRNA expression profiles for the response of human tumor cell lines to the antimalarial drugs artesunate, arteether, and artemeter. *Biochemical Pharmacology* 64:617-623.

Efferth T, A. Sauerbrey, A. Olbrich, E. Gebhart, P. Rauch, H.O. Weber, J.G. Hengstler, M.E. Halatsch, M. Volm, K.D. Tew, D.D. Ross, J.O. Funk (2003b) Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Molecular Pharmacology* 64:382-394.

De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol.* 2004, 30(2):115-33.

Sells MA, Chen ML, Acs G (1987) Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 84:1005-1009.

Schalm SW, Deman RA, Heijtkink RA, Niesters HGM (1995) New nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 22:52-56.

Doong SI, Tsai CH, Schinazi RF, Liotta DC, Cheng YC (1991) Inhibition of the replication of hepatitis B virus *in vitro* by 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine and related analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 88:8495-8499.

Sells MA, Zelent A, Shvartsman M y Acs G (1988) Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *Journal of Virology* 62:2836-2844.

Behrens SE, Grassmann CW, Thiel HJ, Meyers G, Tautz N (1998) Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon. *Journal of Virology* 72:2364-2372.

ES 2 245 248 B1

Fautz R, Husein B y Hechenberger C (1991) Application of the Neutral Red assay (NR assay) to monolayer cultures of primary hepatocytes. Rapid colorimetric viability determination for the unscheduled DNA synthesis test (UDS). *Mutation Research* 235: 173-179.

5 Pugh JC y Bassendine MF (1990) Molecular biology of hepadnavirus replication. *British Medical Bulletin* 46:329-353.

Kaneko S, Feinstone SM y Miller RH (1989) Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 1930-1933.

10 Romero MR, Martinez-Diez MC, Larena MG, Macias RIR, Dominguez M, Garcia-Monzon C, Serrano MA, Marin JGG (2002) Evidence for dual effects of DNA-reactive bile acid derivatives (Bamets) on hepatitis B virus life cycle in an *in vitro* replicative system. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 13:371-380.

15 Acs G, Sells MA, Purcell RH, Price P, Engle R, Shapiro M, Popper H (1987) Hepatitis B virus produced by transfected HepG2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 84:4641-4644.

20 Batty KT, Davis TM, Thu LT, Binh TQ, Anh TK, Ilett KF (1996) Selective high-performance liquid chromatographic determination of artesunate and alpha- and beta-dihydroartemisinin in patients with falciparum malaria. *Journal of Chromatography B. Biomedical Applications* 677:345-350.

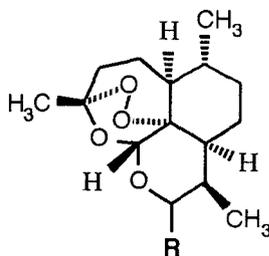
Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z (2002) Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. *Hepatology* 35:1002-1009.

25 Yan YZ, Little B, Meshnick SR (1994) Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH and drug structure. *Biochemical Pharmacology* 48:569-573.

Breve descripción de la invención

30 Los compuestos de la invención, artemisinina y sus derivados, responden a la fórmula general (I)

Fórmula I



45 en la que R puede representar: un grupo cetónico (artemisinina), un grupo hidroxilo (dihidroartemisinina), un grupo amino, hidroxiamino o amido, un radical alquilo o hidroxialquilo, un grupo éster, particularmente un éster del ácido butanodioico (artesanato); un grupo éter, particularmente el éter metílico (artemeter), un derivado de un ácido biliar unido directamente o mediante un espaciador con objeto de modificar sus propiedades fisicoquímicas o de aumentar la vectorización hepática del fármaco. Como tales derivados se entienden los diferentes compuestos de la misma familia, compartiendo todos ellos el puente de endoperóxido O-C-O-C presente en los heterociclos condensados, resultantes de las diferentes posibilidades de sustitución que ofrece el grupo R. La artemisinina reacciona con el hierro libre de las células infectadas por el virus, y el puente endoperóxido se rompe, dando lugar a radicales libres que causan una rápida y extensiva muerte celular.

55 En la presente invención se han empleado células HepG2 2.2.15 para probar experimentalmente el efecto antivírico de la artemisinina y sus derivados, frente al virus de la hepatitis B. Esta línea celular infectada por el HBV de forma estable se obtuvo a partir de células HepG2 de hepatoblastoma humano (Sells *et al.*, 1987), y ha sido un modelo útil “*in vitro*” para la evaluación de nuevos fármacos anti-HBV, así como para investigar varias etapas de la biología del HBV (Schalm *et al.* 1995). Las células HepG2 2.2.15 producen y secretan viriones maduros del HBV, cuya cantidad se puede determinar por la abundancia de DNA vírico o proteínas víricas inmunoreactivas (Sells *et al.* 1987). En condiciones normales de cultivo, en los cultivos de HepG2 2.2.15 están presentes varias formas de HBV-DNA (Doong *et al.* 1991; Sells *et al.* 1987). El perfil de ácidos nucleicos es esencialmente el mismo que se encuentra en el tejido hepático de individuos infectados por el HBV (Sells *et al.* 1988). Estas formas son: doble hebra parcial (pdsDNA), circular covalentemente cerrado (cccDNA), circular relajado (rcDNA), integrado en el genoma de la célula hospedadora (iDNA), monocatenario (ssDNA) y fragmentado (fdNA). Además, se ha demostrado que la cantidad de DNA vírico extracelular varía proporcionalmente a los cambios en el nivel de DNA vírico intracelular (Sells *et al.* 1988).

ES 2 245 248 B1

Se ha llevado a cabo una evaluación *in vitro* del efecto anti-HBV de 20 compuestos extraídos y altamente purificados de los remedios de la MTC. Utilizando células HepG2 2.2.15, se determinó la producción de HBV después de 21 días de cultivo con estos compuestos (0,01 a 100 μM) midiendo la liberación de proteína de superficie (HBsAg) mediante ELISA y de HBV-DNA mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La variedad de formas de DNA vírico liberadas se estudió mediante análisis con transferencia tipo Southern. La toxicidad frente a las células hospedadoras se evaluó con el ensayo de retención de rojo neutro. Basándose en los resultados obtenidos, los compuestos con interés farmacológico ensayados se seleccionaron de acuerdo con los siguientes criterios:

- i) inducen una inhibición pronunciada de la liberación de HBsAg y/o DNA vírico
- ii) a concentraciones a las que la viabilidad de las células hospedadoras no se veía afectada
- iii) y presentando una solubilidad aceptable (moderada-alta) en los medios de cultivo ensayados

La combinación de estos 3 criterios pone de manifiesto el papel como antivírico de la artemisinina y sus derivados, contra la infección por el HBV. Resulta sorprendente dicho efecto antivírico ya que otro amplio número de compuestos de los preparados de la MTC, no presentaron dicho efecto de acuerdo a los 3 criterios de selección expuestos.

A continuación se realizó una evaluación de la artemisinina como agente protector en un modelo "*in vitro*" de la infección de la hepatitis C. Ésta se llevo a cabo infectando una línea de células epiteliales bovinas derivadas de tráquea embrionaria (EBTr) con una cepa citopática (Oregon C24V, genotipo I, subgenotipo b) del virus de la diarrea bovina (BVDV), que, como el HCV, pertenece a la familia *Flaviviridae* (Behrens *et al.*, 1998).

La capacidad protectora frente al BVDV se evaluó por medida de la viabilidad de la célula hospedadora mediante un ensayo con sales de tetrazolio (MTT). Las células se expusieron a un intervalo de diluciones de BVDV durante 18, 24 o 48 horas. El medio se reemplazó por uno recién preparado libre de virus y las células se cultivaron durante tiempos diferentes (72 o 96 horas) para establecer la combinación deseada de dilución de BVDV para la infección, tiempo de exposición y tiempo de incubación, con el fin de obtener el efecto citolítico deseado ($\approx 40\%$), que permite un ensayo adicional de protección de las células hospedadoras por ribavirina (como control positivo) o artemisinina. Estos fármacos se añadieron a células no infectadas e infectadas junto con el medio de incubación. La ribavirina es un componente común de la quimioterapia contra la infección por el HCV. Este fármaco no indujo ningún efecto tóxico en las células no infectadas hasta 100 μM , mientras que las células infectadas tratadas con ribavirina mostraron un incremento significativo en la viabilidad (hasta $\approx 30\%$) al compararlas con células infectadas no tratadas. De forma similar, dentro del intervalo de concentraciones ensayado, la artemisinina no mostró ninguna toxicidad en células no infectadas y también fue capaz de proteger a las células infectadas de la actividad citolítica del BVDV. A concentraciones bajas el efecto protector fue más marcado para la artemisinina de lo que lo fue para la ribavirina.

Los excipientes presentes en los medicamentos antivíricos a base de artemisinina y/o alguno de sus derivados, así como sus rangos de concentración, o el de los principios activos presentes en los mismos, son bien conocidos en el estado de la técnica, toda vez que la artemisinina y sus derivados han sido ya usados en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de la malaria. Así la artemisinina y sus derivados pueden presentarse en formulaciones hidrosolubles, particularmente en forma de artemisinina, artesunato o dihidroartemisinina, pero también presentan solubilidad en formulaciones liposolubles en aceite, como sería el caso del artemeter. Ello permite obtener presentaciones de artemisinina o sus derivados tanto para ingesta oral (sólida o líquida), como inyectables, supositorios, etc. La dosis efectiva de artemisinina o sus derivados con efectos antivíricos en humanos, sin que se presente toxicidad, puede oscilar entre los 3-300 mg/Kg de masa corporal, para una dosis terapéutica que oscila entre 200-1000 mg/día, divididas en varias tomas, con un límite de concentración, para ingesta por vía oral, $< 0.4 \mu\text{g/ml}$.

Una realización también preferida de la invención es la fabricación de medicamentos antivíricos a base de artemisinina o sus derivados, combinados entre ellos o con otro agente antivírico, particularmente con derivados de nucleósidos, como lamivudina, ribavirina, adefovir dipivoxil o emtricitabina.

Otra realización preferida de la invención es el uso de la artemisinina y sus derivados en el que el medicamento fabricado se emplea también en el tratamiento de las patologías asociadas a las hepatitis víricas, particularmente en el tratamiento de la cirrosis, hepatocarcinoma y otras hepatopatías asociadas.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1

Cultivos celulares HepG2 2.2.15 (HBV)

Se sembraron células HepG2 2.2.15 en frascos Roux con medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10%, L-glutamina 4 mM, NaHCO_3 26,2 mM, HEPES 25 mM, 20 mg/1 de gentamicina y 200 mg/100 ml de ciprofloxacino. Después del primer pase, se reemplazó el ciprofloxacino por 150 mg/ml de gentamicina (G418). Las células se utilizaron al tercer pase cuando se sembraron $3,5 \times 10^5$ células en placas de plástico (3,5 cm de diámetro), y se mantuvieron durante tres días antes de cualquier tratamiento, para que alcanzaran condiciones aproximadas a las de confluencia.

ES 2 245 248 B1

5 Durante el período experimental (21 días) se reemplazó el medio de cultivo por uno de reciente preparación, con o sin (condiciones control) diferentes concentraciones de compuestos de la MTC, cada 3 días. Para añadir los fármacos de la MTC se disolvieron primero en DMSO y luego se diluyeron con medio de cultivo hasta alcanzar una concentración final del fármaco igual a la más elevada del intervalo deseado y $\leq 0,2\%$ de DMSO (vol/vol). De esta solución se prepararon diluciones seriadas con el fin de llevar a cabo estudios de dosis-respuesta.

10 La moderada solubilidad en agua de algunos compuestos (Tabla 1) da cuenta del hecho de que su solución inicial en DMSO fue en la mayor parte de los casos clara pero se volvió ligeramente turbia cuando se añadió medio de cultivo para preparar una solución de partida altamente concentrada de 5-25 mM. En la mayor parte de los casos (fármacos clasificados en la Tabla 1 como de solubilidad moderada en el medio de cultivo), la adición de medio de cultivo para alcanzar la concentración final de la solución concentrada (200-600 μM) dio como resultado una solubilización aparentemente completa del compuesto. Si se observó turbidez en la solución concentrada, los compuestos se clasificaron como de baja solubilidad en el medio de cultivo. Esto implica que los estudios de dosis-respuesta dieron como resultado una subestimación parcial de los resultados porque la concentración real de fármaco era menor que la nominal.

15 Los fármacos considerados como de alto interés farmacológico se clasificaron como de solubilidad alta o moderada en el medio de cultivo a 37°C .

Análisis estadístico

20

- Los datos se obtuvieron en, al menos, tres cultivos diferentes en los que cada condición se ensayó por triplicado. Los valores se dan como medias \pm SD. Para calcular la significación estadística de las diferencias dentro de o entre grupos, se utilizaron, según fuera apropiado, el ensayo t para valores apareados o el método de Bonferroni para el análisis de comparaciones múltiples.

25 Ejemplo 2

Evaluación de la toxicidad de los fármacos en las células hospedadoras de HBV

30 La toxicidad celular inducida por los fármacos se evaluó midiendo la cantidad de células vivas en el cultivo en el día 21 de la exposición al fármaco utilizando el ensayo del rojo neutro (RN) (Fautz *et al.* 1991), que está basado en la capacidad de los lisosomas y el aparato de Golgi de las células vivas para absorber este colorante. Para llevar a cabo este ensayo, después de la separación del sobrenadante de las células y un doble lavado de las células con solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS) a 37°C , se añadió 1 ml de RN a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 5%-aire 95% durante 90 minutos. Después de lavar las células de nuevo dos veces con PBS, se eluyó el RN con una solución acuosa que contenía etanol al 50% más ácido acético al 1% durante 10 minutos

35 a temperatura ambiente, y se determinó la cantidad de colorante absorbido por las células midiendo la absorbancia a 540 nm. Después de 21 días de tratamiento con diferentes cantidades de derivados de la MTC, la viabilidad de las células HepG2 2.2.15 se vio afectada de manera diferente según el compuesto estudiado. Para la artemisinina no se encontró una reducción en este parámetro hasta concentraciones superiores a 100 μM (Figura 1). El artesunato, la berberina y el ácido tánico indujeron toxicidad en las células hospedadoras a $\geq 10 \mu\text{M}$, mientras que la citotoxicidad inducida por la curcumina se encontró a 100 μM (Tabla 1). Para el resto de los compuestos no se encontró ninguna toxicidad en el intervalo de concentraciones utilizado en este estudio.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

ES 2 245 248 B1

TABLA 1

Toxicidad en las células hospedadoras, efecto antivírico frente a HBV e interés farmacológico de los derivados de la MTC ensayados

Nombre del Compuesto	Concentración más baja del fármaco con efecto citotóxico	CI50 (50% de inhibición de la liberación de HBsAg)	Efecto sobre la liberación de DNA del HBV a 100 μ M	Solubilidad en medio de cultivo a 37°C
Artemisinina	>100 μ M	55 μ M	+156%	M
Artesunato	10 μ M	3,8 μ M	-100%	A
Berberina	10 μ M	14,6 μ M	-50%	B
Ácido tánico	10 μ M	15 μ M	+134%	A
Curcumina	100 μ M	84 μ M	+127%	B
Baicaleína	>100 μ M	>100 μ M	-33%	M
Ácido glicirricínico	>100 μ M	>100 μ M	-64%	M
Puerarina	>100 μ M	>100 μ M	-56%	A
Bufalina	>100 μ M	>100 μ M	+128%	A
Disulfuro de dialilo	>100 μ M	>100 μ M	+68%	M
Baicalina	>100 μ M	>100 μ M	+28%	A
Daidzeína	>100 μ M	>100 μ M	+76%	B
Daidzina	>100 μ M	>100 μ M	+19%	A
Isonardosinón	>100 μ M	>100 μ M	+50%	A
Nardofurano	>100 μ M	>100 μ M	+43%	A
Nardosinón	>100 μ M	>100 μ M	+5%	M
Tetrahidronardosinón	>100 μ M	>100 μ M	+211%	A
Quercetina	>100 μ M	>100 μ M	+37%	A

Solubilidad en medio de cultivo: Alta (A), Moderada (M), Baja (B)

Ejemplo 3

Análisis de la liberación de HBsAg al medio de cultivo

- 5 Se utilizó ELISA en fase sólida, utilizando el “Sistema 3 del ensayo ELISA del Anticuerpo ORTHO frente al HBsAg” (Ortho-Clinical Diagnostics, Madrid, España) para cuantificar las cantidades de proteína de la envuelta del HBV, antígeno de superficie (HBsAg), liberada de las células infectadas al medio de cultivo. Los resultados se normalizaron mediante los valores encontrados en las células sin tratar del mismo cultivo, que se consideraron como 100%.
- 10 Se debería señalar que la medida del HBsAg secretado por las células HepG2 2.2.15 del día 18 al día 21 de exposición a compuestos de la MTC no fue una estimación precisa de la abundancia de partículas víricas completas porque no todas las proteínas inmunorreactivas presentes en el medio formaban parte de viriones completos – es decir, no todas ellas se pueden incluir en “partículas de Dane”-. En realidad, algunas de ellas se pueden liberar al medio o pueden formar parte de partículas víricas libres de genoma (Pugh y Bassendine 1990). Por ello, un incremento en el
- 15 HBsAg no implica necesariamente un incremento en la producción de viriones. En contraste, una reducción marcada en la producción de HBsAg estaría asociada con más probabilidad con una liberación de viriones disminuida. Varios de los compuestos de la MTC ensayados inhibieron la secreción de HBsAg (Tabla 1). Así, el artesunato fue el inhibidor más fuerte, con CI50 <10 μ M, que el resto de los compuestos ($p < 0,05$). La berberina y el ácido tánico también fueron inhibidores buenos, pero menos potentes, con CI50 entre 10 y 20 μ M ($p < 0,05$ frente a compuestos con actividad menor), mientras que la artemisinina y la curcumina tuvieron valores de CI50 entre 50 y 100 μ M ($p < 0,05$ frente a compuestos con actividad menor). Los otros compuestos fueron inhibidores muy pobres o su capacidad no se observó en absoluto en el intervalo de concentraciones utilizado.

Ejemplo 4

25 *Liberación de HBV-DNA al medio de cultivo*

- Para determinar la abundancia del HBV-DNA en el medio de las células tratadas, se utilizó PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Se recogió el sobrenadante de células HepG2 2.2.15 del cultivo y se extrajo el DNA utilizando una adaptación del método de la digestión alcalina (Kaneko *et al.* 1989), tal como se ha comunicado previamente (Romero *et al.* 2002). La solución se neutralizó con HCl 0,12 N y se diluyó, según fuera apropiado, antes de utilizarla para la Q-PCR. Las secuencias de los oligonucleótidos cebadores de la síntesis en ambos sentidos de la doble cadena de DNA y de la sonda fluorógena Tagman[®] han sido publicadas previamente (Romero *et al.* 2002). En el análisis del DNA-HBV no se confirmó ninguna interferencia de los compuestos con la Q-PCR tal como se ha descrito anteriormente (datos no mostrados). Las curvas patrón necesarias para calcular la cantidad de copias de DNA en cada muestra se obtuvieron utilizando una sonda del HBV de 904 pb con 100% de similitud con el DNA del subtipo ayw del HBV, tal como se ha descrito previamente (Romero *et al.*, 2002). Esta sonda se utilizó también para llevar a cabo análisis con transferencia tipo Southern de la liberación del HBV-DNA, tal como se ha informado previamente (Romero *et al.*, 2002). Brevemente, se aisló DNA vírico por precipitación con polietilenglicol, se purificó mediante el tratamiento con proteinasa K, y se desproteinizó mediante la extracción con fenol/cloroformo (Acs *et al.* 1987). Alícuotas de DNA correspondientes a diferentes condiciones experimentales se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y se transfirieron a continuación a una membrana de nylon cargada positivamente (Biodine B plus, Pall Gelman, Madrid, España) para llevar a cabo la hibridación con la sonda de DNA del HBV de 904 pb marcada con ³²P-dCTP.

- 45 La determinación de la cantidad de HBV-DNA liberado al medio de cultivo de HepG2 2.2.15 durante diferentes tratamientos comparada con la encontrada en las condiciones control reveló varios patrones de respuesta. En algunos casos (artesunato y berberina), ocurrió una reducción en este parámetro, acompañada por una disminución de la liberación de HBsAg (Tabla 1). En el caso de la baicaleína, el ácido glicirricínico y la puerarina, se observó una inhibición moderada de la liberación HBV-DNA en presencia de un efecto débil o nulo sobre la secreción de HBsAg (Tabla 1).
- 50 En las células tratadas con artemisinina, ácido tánico o curcumina, la abundancia de HBV-DNA en el medio se incrementó a pesar de la reducción de la cantidad de HBsAg (Tabla 1). En los otros compuestos, que no tuvieron ningún efecto sobre la liberación de HBsAg, la cantidad de HBV-DNA en el medio no se alteró sustancialmente (daidzina y nardosinón) o se incrementó en un grado de moderado (baicalina, disulfuro de dialilo, daidzeína, isonardosinón, nardofurano y quercetina) a alto (bufalina y tetrahidronardosinón).

55 *Patrón de formas de HBV-DNA en el medio de cultivo*

- El análisis con transferencia tipo Southern indicó que la mayoría del HBV-DNA presente en el medio de las células HepG2 2.2.15 en las condiciones control (datos no mostrados) estaba principalmente en forma de rcDNA, ssDNA y pdsDNA, tal como ha sido previamente descrito por otros (Sells *et al.* 1998) y confirmado por nosotros (Romero *et al.*, 2002). Sin embargo, también se vieron otras formas. Éstas fueron: cccDNA e iDNA, liberados probablemente de células muertas despegadas, y formas de bajo peso molecular, que probablemente correspondían a copias incompletas del genoma de diferentes tamaños y/o nucleosomas fragmentados que contenían parte del genoma del HBV-DNA (fDNA). Todas estas formas de HBV-DNA también se observaron en células tratadas durante 21 días con artemisinina (inserto de la Figura 1). El patrón de bandas era similar en la mayor parte de los casos, exceptuando algunos de los compuestos capaces de intensificar la liberación de HBV-DNA, en los cuales el análisis con transferencia tipo Southern indicó que la mayor abundancia de HBV-DNA no se veía justificada por un incremento en la proporción de partículas completas que contenían pdsDNA, sino más bien por un incremento en la liberación de rcDNA.

ES 2 245 248 B1

Ejemplo 5

Cultivos celulares e infección vírica con BVDV

5 Se sembró una línea de células epiteliales bovinas de tráquea embrionaria (EBTr) en frascos Roux con MEM GLUTAMAX suplementado con FCS al 10%, 50 mg/l de gentamicina y una mezcla antibiótica/antimicótica para cultivos celulares (Sigma-A7292). Las células se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO₂ 5%: aire 95% con aproximadamente 80% de humedad hasta que se alcanzó la confluencia después de tres a siete días de cultivo. Una vez que las células se despegaron mediante un tratamiento suave con tripsina, se contaron en una cámara Thoma y luego se sembraron en placas de 96 pocillos (15 x 10³ células/pocillo; 50 µl/pocillo). Se dejó que las células se adhirieran a los pocillos durante 2 horas antes de añadir 50 µl de medio de cultivo con la dilución deseada de virus de la diarrea bovina (BVDV; cepa citopática Oregon C24V, genotipo I, subgenotipo b). El medio que contenía BVDV se separó después de 18, 24 ó 48 horas del período de infección.

15 *Análisis estadístico*

Los datos se obtuvieron en tres o cuatro cultivos celulares en los que cada condición se ensayó en 8 pocillos diferentes. Los valores se dan como medias±SD. Para calcular la significación estadística de las diferencias dentro de o entre grupos, se utilizaron, según fuera apropiado, el ensayo t para valores apareados o el método de Bonferroni para el análisis de comparaciones múltiples.

La infección de células EBTr con la cepa seleccionada de BVDV se ha utilizado como un modelo “*in vitro*” aceptado para realizar el ensayo sistemático colectivo de fármacos anti-HCV. Sin embargo, una exposición continua a la presencia de cantidades muy elevadas de BVDV en el medio de cultivo podría no reflejar la situación real en la mayor parte de los casos de hepatitis C crónica e inducir un efecto citolítico demasiado fuerte. Como tal, la producción de virus se añade a la exposición impuesta y el efecto final es menos reproducible. Por ello, se ha modificado el modelo simulando un período de infección que iba seguido por un tiempo de incubación en el que las células infectadas mostraban el efecto citopático del BVDV. Se ensayaron varias combinaciones de duración tanto de la infección con diferentes diluciones de una solución concentrada de viriones, como del período de incubación una vez retirado el medio con viriones. Intentamos obtener una reducción reproducible de la viabilidad celular de -40% para asegurar una población celular remanente suficientemente sana como para poder recuperarse de la infección pero con una reducción de la viabilidad celular suficientemente fuerte como para permitir la observación de cualquier efecto protector inducido por el fármaco. Nuestros resultados indicaron que un tiempo de infección de 48 horas seguido de un tiempo de incubación de 72 horas era la mejor combinación (Figura 2). Esto permitió calcular la dilución exacta de la solución concentrada de partículas víricas para lograr una supervivencia celular inicial del 60% de las células infectadas antes de añadir los fármacos.

Ejemplo 6

40 *Efecto antivírico frente a BVDV y toxicidad en células hospedadoras*

Las células infectadas y no infectadas se lavaron dos veces con medio de cultivo libre de virus y se incubaron de nuevo con 100 µl de medio de cultivo libre de virus que contenía la concentración deseada de artemisinina o ribavirina disueltos previamente en DMSO (concentración final en el medio de cultivo <0,2%) durante 72 ó 96 horas. La viabilidad celular al final del período experimental se midió mediante el ensayo de Promega (Innogenetics, Barcelona, España), basado en sales de tetrazolio (CellTiter 96[®] AQueous). El efecto tóxico se dedujo de la reducción de la viabilidad celular en las células tratadas no infectadas, mientras que la protección antivírica se reveló por el incremento en el número de células después del efecto citopático inducido por el BVDV.

50 Cuando se investigó la toxicidad en células hospedadoras no infectadas (Figura 3), se encontró que ni la ribavirina ni la artemisinina tuvieron ningún efecto deletéreo sobre las células hospedadoras no infectadas al menos hasta los más altos niveles de concentración utilizados en el presente estudio (100 µM).

El estudio de la protección antivírica inducida por estos fármacos (Figura 4) reveló que, como se esperaba, la ribavirina llevó a cabo un efecto protector significativo de hasta 30% en las células hospedadoras infectadas. La artemisinina, de forma similar, fue capaz de llevar a cabo un efecto protector significativo frente al BVDV. Sin embargo, a concentraciones bajas (<50 µM) este efecto era significativamente más elevado que el de la ribavirina, aunque a concentraciones altas (≥50 µM) el efecto de ambos fármacos no fue significativamente diferente.

60 Estos hallazgos ponen de manifiesto el valor de la artemisinina como nuevo agente antivírico frente a la infección por el HCV. La artemisinina y sus derivados ya han sido utilizados para tratar la malaria en gran número de pacientes. Por ello hay una considerable experiencia en la práctica clínica con estos fármacos a partir de la cual no se ha comunicado ninguna toxicidad relevante (Batty, 1996). Además, debido al hecho de que los mecanismos de acción de la ribavirina (Lau, 2002) y la artemisinina (Yan, 1994) son probablemente diferentes, existe la posibilidad de un efecto sinérgico de los fármacos en una terapia combinada.

Descripción de las figuras

Figura 1. Efecto sobre la viabilidad celular (zona sombreada) y la liberación de HBsAg (círculos) y HBV-DNA (barras) al medio de cultivo por parte de las células HepG2 2.2.15 después de 21 días de cultivo en presencia de la concentración indicada (que variaba de 0,01 a 200 μM) de artemisinina (A) o de su derivado el artesunato (B). Al final del período experimental se recogió el medio para llevar a cabo medidas de la abundancia de HBsAg y HBV-DNA, y se ensayó en las células su viabilidad utilizando el ensayo del rojo neutro. Los valores son medias \pm SD de tres cultivos diferentes en los que cada punto de datos era el valor medio de tres placas diferentes. Están expresados como porcentajes de determinaciones llevadas a cabo en placas a las que no se había añadido ningún fármaco (0 μM o control). *, $p < 0,05$ comparando la abundancia de HBsAg en los controles; ‡, $p < 0,05$ comparando la liberación de HBV-DNA con los controles; †, $p < 0,05$ comparando la viabilidad celular con los controles. Una significación estadística similar se obtuvo para valores situados a la derecha de la flecha. El recuadro representa el análisis con transferencia tipo Southern del HBV-DNA hallado en el medio de cultivo de la concentración indicada de fármaco. Las posiciones esperadas para las formas conocidas del HBV-DNA, es decir, circular relajado (rcDNA), circular parcialmente bicatenario (pdsDNA), circular cerrado covalentemente (cccDNA), monocatenario (ssDNA), formas integradas (iDNA) y formas fragmentadas (fDNA) están indicadas a la derecha..

Figura 2. Efecto del tiempo de exposición e incubación de la línea de células epiteliales bovinas derivadas de tráquea embrionaria (EBTr) con el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV; cepa citopática Oregon C24V, genotipo I, subgenotipo b) sobre la eficiencia de la infección medida mediante la viabilidad celular al final del período experimental. Las flechas y las líneas discontinuas se utilizan para indicar la dilución de BVDV seleccionada para inducir una reducción de 40% en la población de células, que se utilizó en experimentos subsiguientes sobre el efecto antivírico de los fármacos. Los valores son medias \pm SD de 24 medidas llevadas a cabo en tres cultivos diferentes, *, $P < 0,05$ al comparar con células control no infectadas cultivadas en condiciones similares, mediante el ensayo *t* para valores apareados.

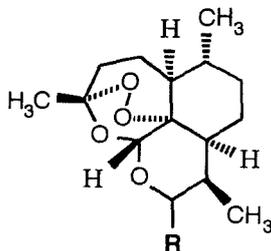
<u>Símbolo</u>	<u>Exposición</u>	<u>Incubación</u>
Rombo	18 h	72 h
Cuadrado	24 h	72 h
Triángulo	24 h	96 h
Círculo	48 h	72 h

Figura 3. Efecto sobre la viabilidad de la línea de células epiteliales bovinas derivadas de tráquea embrionaria (EBTr) de la incubación con las concentraciones indicadas de ribavirina (cuadrados sin relleno) y artemisinina (círculos sin relleno) durante 72 horas. Los valores son medias \pm SD de 32 medidas llevadas a cabo en cuatro cultivos diferentes. *, $P < 0,05$ al comparar con células control no infectadas cultivadas en condiciones similares en ausencia de cualquiera de estos fármacos, mediante el ensayo *t* para valores apareados. †, $P < 0,05$, al compararlo con el efecto de la misma concentración de ribavirina mediante el método de Bonferroni para el análisis de comparaciones múltiples.

Figura 4. Efecto de la incubación con las concentraciones indicadas de ribavirina (cuadrados negros) y artemisinina (círculos negros) durante 72 horas sobre la viabilidad de la línea de células epiteliales bovinas derivadas de tráquea embrionaria (EBTr) infectadas mediante la exposición al virus de la diarrea vírica bovina (BVDV; cepa citopática Oregon C24V, genotipo I, subgenotipo b) durante 48 horas antes de añadir el fármaco. Los valores son medias \pm SD de 32 medidas llevadas a cabo en cuatro cultivos diferentes. *, $P < 0,05$ al comparar con células control no infectadas cultivadas en condiciones similares en ausencia de cualquiera de estos fármacos, mediante el ensayo *t* para valores apareados. †, $P < 0,05$, al compararlo con el efecto de la misma concentración de ribavirina mediante el método de Bonferroni para el análisis de comparaciones múltiples.

REIVINDICACIONES

1. Uso de la artemisinina o de sus derivados **caracterizados** por la fórmula I



en la que R puede representar: un grupo cetónico (artemisinina), un grupo hidroxilo (dihidroartemisinina), un grupo amino, hidroxiamino o amido, un radical alquilo o hidroxialquilo, un grupo éster, particularmente un éster del ácido butanodioico (artesanato); un grupo éter, particularmente el éter metílico (artemeter), un halógeno, un derivado de un ácido biliar unido directamente o mediante un espaciador, así como los posibles esteroisómeros de estas variantes, en la fabricación de medicamentos útiles como agentes antivíricos, con excepción de su uso frente a citomegalovirus.

2. Uso de la artemisinina o sus derivados según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el virus causante de la infección pertenece a la familia de los hepadnavirus.

3. Uso de la artemisinina o sus derivados según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el virus causante de la infección pertenece a la familia de los flavivirus.

4. Uso de la artemisinina o de sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en que el medicamento fabricado es útil en el tratamiento de infecciones hepáticas en seres humanos causadas por virus.

5. Uso de la artemisinina o de sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, **caracterizado** porque el virus causante de la infección es el virus de la hepatitis B (HBV).

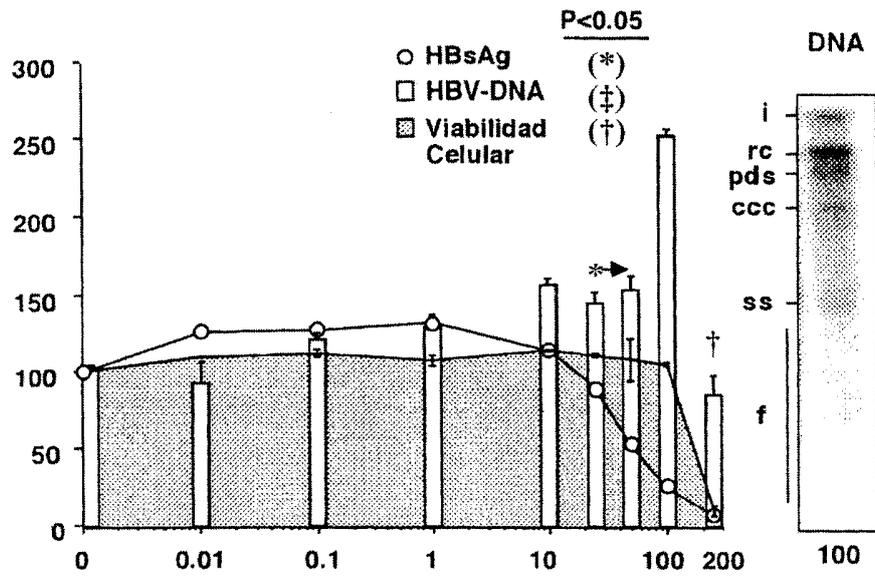
6. Uso según la reivindicación 5 del artesanato en la fabricación de medicamentos útiles en el tratamiento de infecciones hepáticas en seres humanos causadas por el virus de la hepatitis B (HBV).

7. Uso de la artemisinina o de sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4, **caracterizado** porque el virus causante de la infección es el virus de la hepatitis C (HCV).

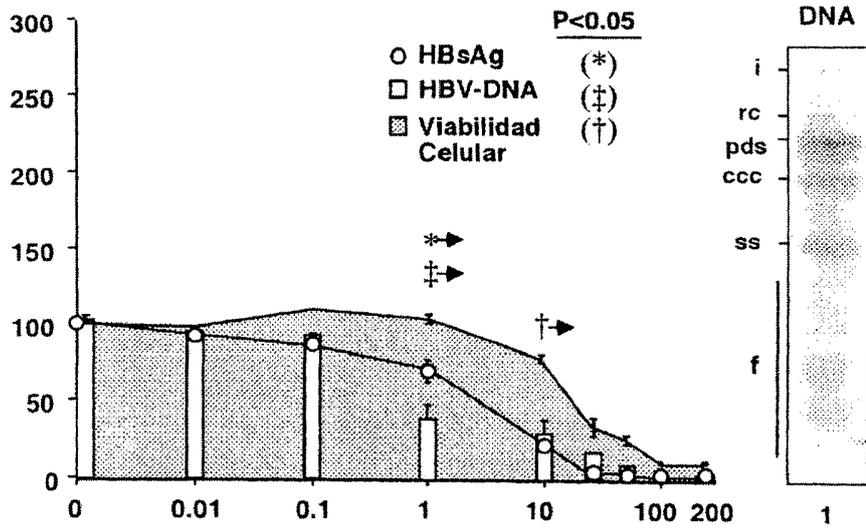
8. Uso de la artemisinina o de sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, **caracterizado** porque el virus causante de la infección es el virus de la diarrea bovina (BVDV).

9. Uso de la artemisinina según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, **caracterizado** porque el medicamento fabricado contiene opcionalmente un derivado de nucleósidos con actividad antivírica seleccionada entre la lamivudina, la ribavirina, emcitracitabina o el adefovir dipivoxil.

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado** porque el medicamento fabricado se emplea también en el tratamiento de las patologías hepáticas asociadas a las infecciones víricas, particularmente en el tratamiento de la cirrosis y/o hepatocarcinoma.



A



B

FIG. 1

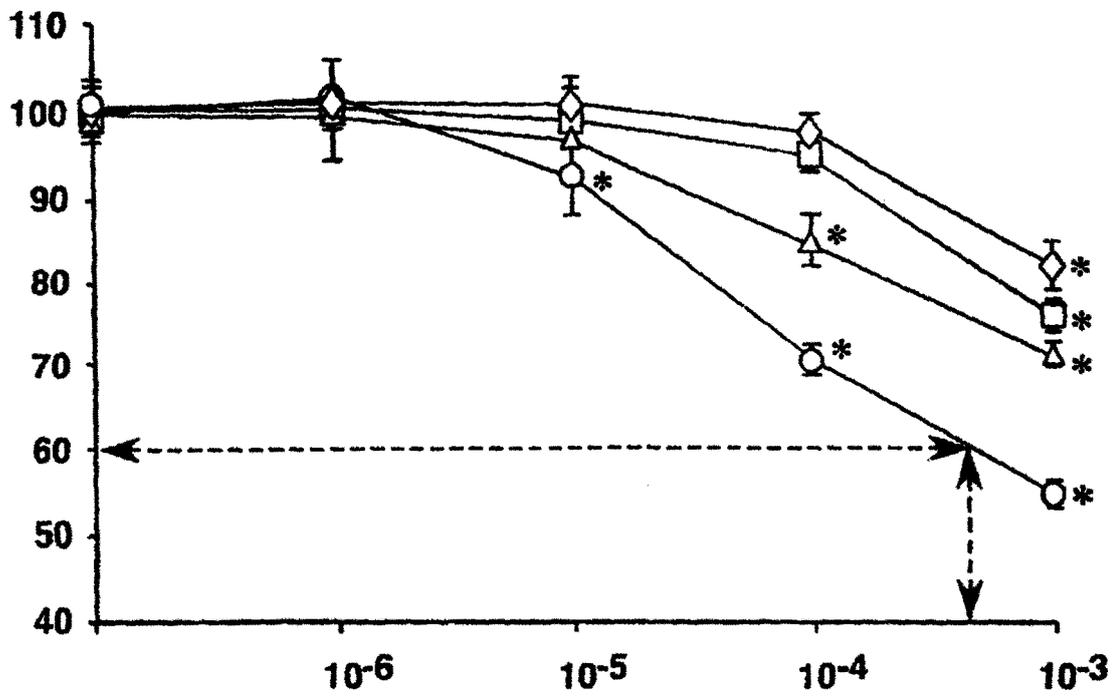


Fig. 2

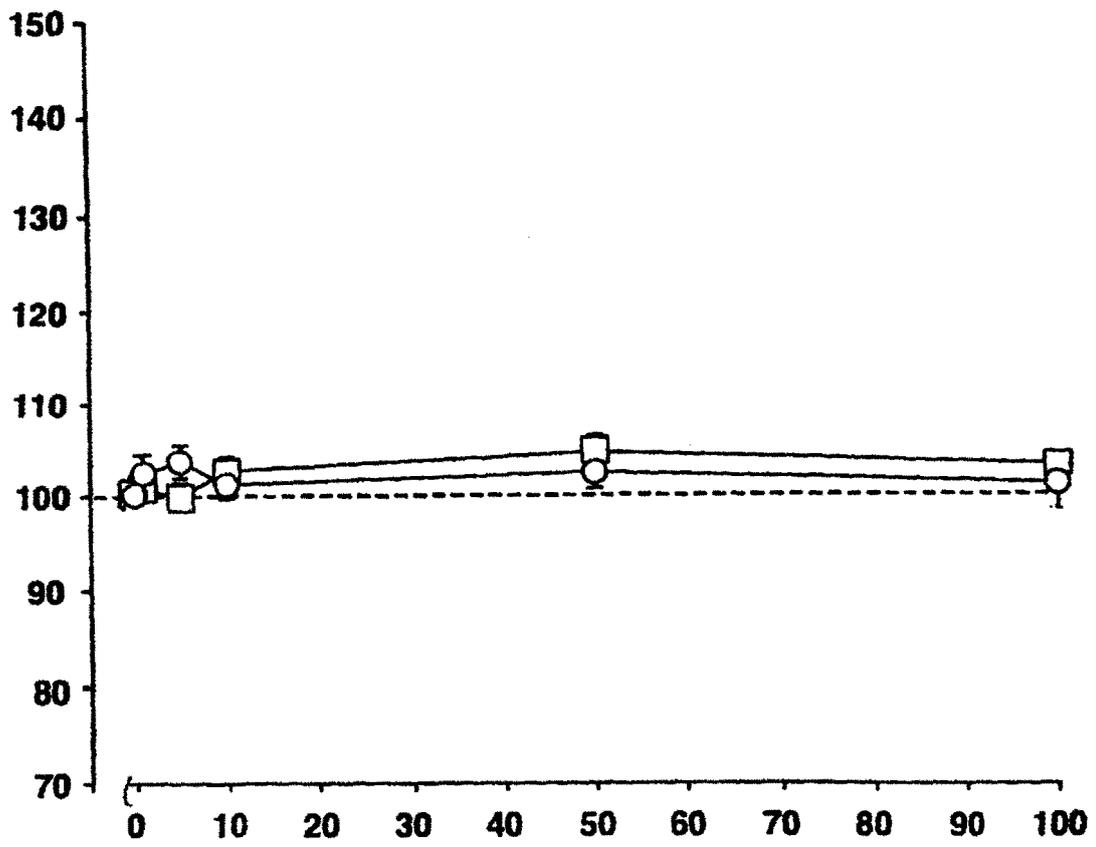


Fig. 3

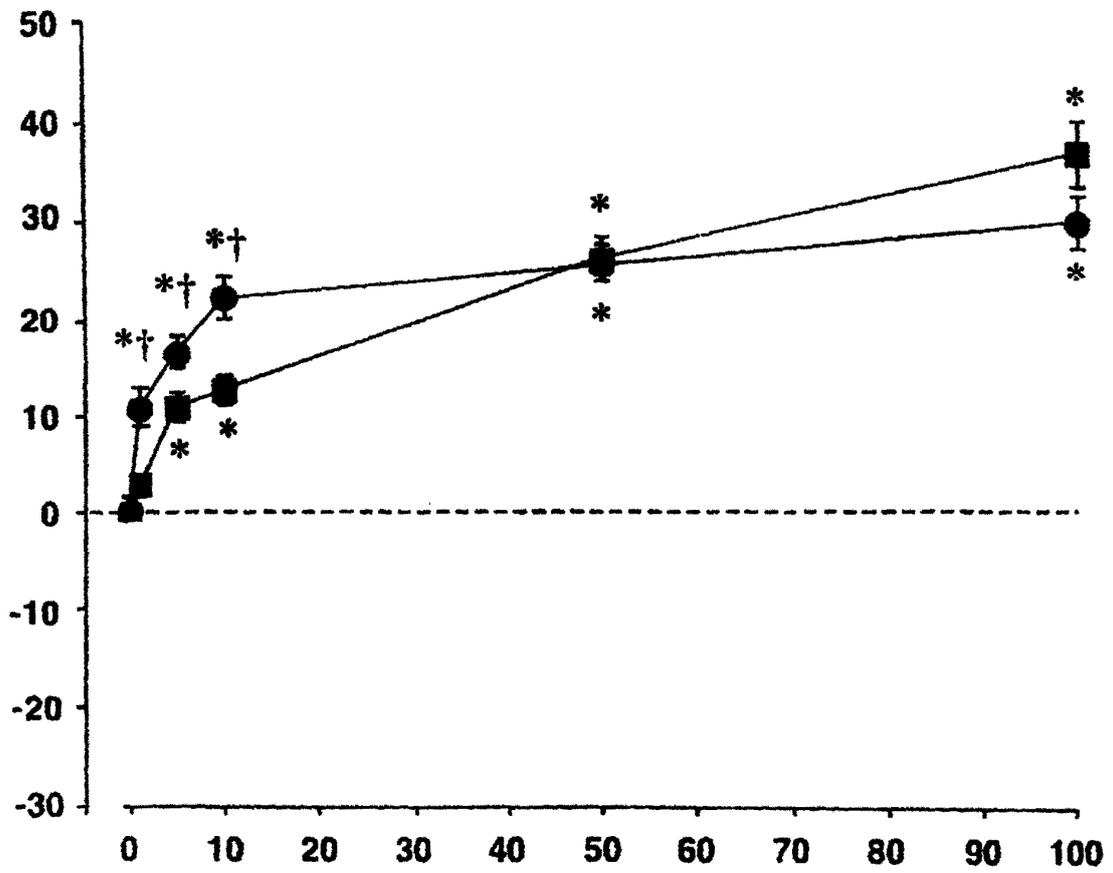


Fig. 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 245 248

② Nº de solicitud: 200401396

③ Fecha de presentación de la solicitud: 09.06.2004

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 31/335, 31/365, 35/78, A61P 31/12

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2004041176 A2 (KEMIN PHARMA EUROPE B.V.B.A.) 21.05.2004, páginas 3-8; reivindicaciones 1-3,6-9.	1-4,7,8,10
Y		5,6
Y	SCHALM, S.W. et al. "New nucleoside analogues for chronic hepatitis B". Journal of Hepatology. 1995. Vol. 22, supl. 1, páginas 52-56.	5,6,9
Y	EP 0903148 A2 (SCHERING CORPORATION) 24.03.1999, reivindicación 1.	9
X	DE 19843383 A1 (JOMAA, H.) 30.03.2000, página 9, líneas 5-44.	1
A	KHAN, M.M. Abid Ali et al. "Occurrence of some antiviral sterols in Artemisia annua". Plant Science. 1991. Vol. 75, nº 2, páginas 161-165.	1
A	US 5219880 A (THORNFELDT) 15.06.1993	1
A	EP 0428773 A1 (DERMATOLOGIC RESEARCH CORPORATION) 29.05.1991	1
E	WO 2004071506 A1 (GEORGETOWN UNIVERSITY) 26.08.2004, páginas 4-7; reivindicaciones 1-4,8.	1,2,5-7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

07.09.2005

Examinador

Asha Sukhwani

Página

1/1