

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 859 476**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2017 PCT/GB2017/051865**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.01.2018 WO18007788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2017 E 17736709 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3478322**

54 Título: **Métodos y compuestos para el tratamiento o la prevención de la gripe grave**

30 Prioridad:

02.07.2016 GB 201611712

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

04.10.2021

73 Titular/es:

**ORPH PHARMA IP COMPANY LIMITED (100.0%)
Queen Mary Bioenterprises Innovation Centre 42
New Road
London E1 2AX, GB**

72 Inventor/es:

**WHITTAKER, PAUL, ANDREW y
TORBETT, NEIL, EDWARD**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 859 476 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y compuestos para el tratamiento o la prevención de la gripe grave

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos y compuestos para el tratamiento de la gripe grave. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la gripe grave.

10 **Antecedentes de la invención**

La gripe se presenta a nivel mundial con una tasa de ataque anual estimada en el 5 % - 10 % en adultos y 20 %-30 % en niños. Las enfermedades pueden dar como resultado la hospitalización y la muerte principalmente entre los grupos de alto riesgo (los muy jóvenes, los ancianos o los enfermos crónicos). A nivel mundial, se estima que estas epidemias anuales provocan entre 3 y 5 millones de casos de enfermedades graves y entre 250.000 y 500.000 muertes. (Véase la hoja informativa número 211 de la OMS: <https://web.archive.org/web/20160613040907/http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>).

En Norteamérica, la gripe estacional causa un exceso de hospitalizaciones en 230-1670 por cada 100.000 personas > de 65 años, 32.000 muertes por causas respiratorias/cardiovasculares y 43.000 muertes por todas las causas al año. Las personas con afecciones médicas crónicas (por ejemplo, enfermedades pulmonares, cardiovasculares, hepáticas, renales y neurológicas, diabetes o inmunosupresión) tienen un riesgo > 30 veces mayor de hospitalización y muerte. Entre los subtipos de gripe estacional en circulación, el H3N2 suele ser una causa más frecuente de enfermedad grave y hospitalización. (Véase Lee, N. *et al.*, Outcomes of adults hospitalised with severe influenza, Thorax, 2010; 65: 510-515).

La situación puede ser aún peor durante las pandemias de gripe. A principios de 2009, surgió un nuevo virus de la gripe A/H1N1 (pH1N1) que rápidamente provocó una pandemia. Se ha estimado que en algunas poblaciones, hasta un 20-40 % de las personas se vieron afectadas y dio como resultado hospitalizaciones y muertes excesivas. En los Estados Unidos, entre 195.000 y 403.000 personas fueron hospitalizadas por una infección grave por pH1N1 y hasta abril de 2010 murieron 8.870-18.300. El virus pH1N1 ha continuado circulando junto con los virus de la gripe estacional en la comunidad.

Si bien la mayoría de los pacientes desarrollan una infección leve del tracto respiratorio superior con pH1N1, algunos progresan hasta desarrollar complicaciones graves del tracto respiratorio inferior, tal, por ejemplo, como neumonía, o transición a experimentar síntomas que no se resuelven o mejoran después de varios días (> 2 días). A diferencia de la gripe estacional, los adultos jóvenes y las personas previamente sanas también pueden desarrollar complicaciones respiratorias graves como, por ejemplo, amigdalitis y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Entre los adultos hospitalizados, entre el 9-34 % puede requerir cuidados intensivos debido a la insuficiencia respiratoria progresiva, que puede estar asociada con una alta mortalidad (14-46 %); de forma notable, algunas de las manifestaciones (por ejemplo, neumonía, SDRA, fallo multiorgánico) son bastante similares a los de la gripe aviar H5N1. (Véase Lee, N. *et al.*, Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among hospitalised adults, PLoS One, 2011; 6: e26050).

El documento WO 01/19322 A2 (SmithKline Beecham Corp) reivindica un método para tratar la neumonía inducida por gripe, método que comprende administrar al ser humano una cantidad eficaz de un inhibidor CBSP/p38.

Las MAP quinasas p38 comprenden una subfamilia de proteínas quinasas activadas por mitógenos que regula una variedad de procesos celulares, incluidos los procesos de crecimiento celular, diferenciación celular, apoptosis y respuestas celulares a la inflamación. Las MAP quinasas p38 están reguladas por receptores de citocinas y se pueden activar en respuesta a patógenos bacterianos o víricos.

El documento WO 2004/076450 A1 desvela el uso de ciertos derivados de pirazolopiridina para el tratamiento o la prevención de enfermedades mediadas por TNF- α , IL-1, IL-6 y/o IL-8, incluyendo enfermedades inmunitarias, autoinmunes e inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, trastornos de la reabsorción ósea, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades proliferativas y procesos asociados con la inducción de ciclooxygenasa-2.

El documento WO 02/059083 A2 (SmithKline Beecham Corp) reivindica el uso de compuestos y composiciones sustituidas de 2,4,8-trisustituido-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona para tratar una amplia gama de enfermedades mediadas por la CBSP/p38 quinasa, incluyendo SDRA, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y neumonía inducida por gripe.

El documento US 2011/003848 A1 (Butcher) describe el uso de la forma polimórfica del inhibidor de la MAP quinasa p38, N-[3-*terc*-butil-1-(3-cloro-4-hidroxifenil)-1H-pirazol-5-il]-N'-{2-[(3-{2-[(2-hidroxi)etil]sulfanil]fenil}[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-6-il)sulfanil]benzil]urea, para el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias obstructivas,

restrictivas o inflamatorias de cualquier tipo, etiología o patogenia.

A su vez, el documento WO 2015/173788 A1 (Westfälische Wilhelms-Universität Münster) reivindica un inhibidor de MEK, un inhibidor de p38 y/o un inhibidor de NF-κB para su uso en un método para la profilaxis y/o el tratamiento de una coinfección que comprende una infección bacteriana y una infección por virus de la gripe o una infección bacteriana sola.

Generalmente, tal como se analiza con más detalle a continuación, se han propuesto varios agentes antiinflamatorios diferentes en la técnica para tratar la inflamación asociada con la infección por gripe.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la gripe grave como: gripe en pacientes que presentan síntomas clínicos y/o radiológicos de enfermedad del tracto respiratorio inferior, implicación del sistema nervioso central ("SNC"), deshidratación grave o que presentan complicaciones secundarias, tales como insuficiencia renal, insuficiencia multiorgánica y choque séptico (otras complicaciones pueden incluir rhabdomiólisis y miocarditis); la gripe en donde hay un empeoramiento de una enfermedad crónica subyacente; la gripe en donde exista cualquier otra afección o presentación clínica que requiera ingreso hospitalario para el manejo clínico; y la gripe en donde hay cualquiera de los siguientes signos y síntomas de enfermedad progresiva:

Síntomas y signos que sugieren insuficiencia de oxígeno o insuficiencia cardiopulmonar: Disnea (con actividad o en reposo), dificultad para respirar, taquipnea, presencia de cianosis, esputo con sangre o con color, dolor de pecho y presión arterial baja; en niños, respiración rápida o dificultosa; e hipoxia, según lo indique la oximetría de pulso o la gasometría arterial;

Síntomas y signos que sugieren complicaciones del SNC: Estado mental alterado, inconsciencia, somnolencia o dificultad para despertar y convulsiones (crisis epilépticas) recurrentes o persistentes, confusión, debilidad grave o parálisis;

Evidencia de replicación vírica sostenida o diseminada o infección bacteriana secundaria invasiva basada en pruebas de laboratorio o signos clínicos (por ejemplo, fiebre alta persistente o recurrente y otros síntomas más allá de 2 o 3 días sin signos de resolución); y

Deshidratación grave, manifestada como disminución de la actividad física o mental, mareo, disminución de la producción de orina y letargo. (Véase las Pautas de la OMS para el manejo farmacológico de la gripe A pandémica (H1N1) 2009 y otros virus de la gripe, Revisado en febrero de 2010, Recomendaciones de la Parte I, pág. 5).

La gripe no complicada es una inflamación leve del tracto respiratorio superior. La inflamación es parte de la compleja respuesta biológica de los tejidos corporales a los estímulos dañinos que dañan las células, tales como virus, toxinas o irritantes; es una respuesta protectora que implica al sistema inmunitario, los vasos sanguíneos y numerosas proteínas. El propósito de la inflamación es eliminar la causa inicial de la lesión celular, limpiar las células muertas y moribundas e iniciar la reparación del tejido. En la gripe no complicada, la inflamación es de corta duración y la reparación del revestimiento de células epiteliales dañadas de las vías respiratorias superiores comienza aproximadamente 2-3 días después de la aparición de los síntomas.

A diferencia de la gripe sin complicaciones, la respuesta inflamatoria en la gripe grave es exagerada o extendida, respectivamente. En lugar de ser protectora, la respuesta se vuelve destructiva. Los altos niveles de proteínas proinflamatorias (citocinas) en la sangre son una indicación temprana de resultados clínicos deficientes en pacientes con gripe (Lee, N. *et al.* 2011). En estos pacientes, la respuesta inflamatoria exagerada puede provocar daños en los vasos sanguíneos del pulmón y otros tejidos, lo que da como resultado una fuga de líquido al tejido (edema). La acumulación de líquido y de células inmunitarias en los pulmones puede provocar neumonía, lesión pulmonar aguda y SDRA e insuficiencia respiratoria en casos graves. La respuesta inflamatoria exagerada en la gripe grave puede verse como un proceso no lineal en el que hay un punto crítico, una transición de fase o un punto de inflexión, cuando la respuesta inflamatoria normal se convierte en una respuesta anómala o más destructiva. En la gripe grave, en lugar de seguir un camino de resolución después de los síntomas máximos alrededor del día 3 después de la infección, los pacientes progresan hasta desarrollar otras complicaciones respiratorias, un proceso promovido por una respuesta inflamatoria exagerada.

La hipercitocinemia se define como un aumento repentino en los niveles de citocinas proinflamatorias en circulación, tales como IL-1, IL-6 y TNF (Croft, M., The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases, *Nat Rev Immunol*, 2009; 9: 271-85). La hipercitocinemia se observa en infecciones graves con tres virus de la gripe principales: la pandemia de gripe española H1N1 de 1918-19; la gripe aviar H5N1 y; la pandemia de gripe H1N1 de 2009. En comparación con el H1N1 humano, los virus H5N1 son inductores más potentes de citocinas proinflamatorias en las células epiteliales respiratorias humanas primarias, y es probable que esta hiperinducción de citocinas contribuya a la gravedad de la enfermedad del H5N1. Se desconoce el mecanismo exacto de la hipercitocinemia en la gripe, pero las células endoteliales se han identificado como reguladores centrales de la "tormenta de citocinas" (Teijaro JR *et al.*, *Endothelial Cells are Central Orchestrators of Cytokine Amplification during Influenza Virus Infection*, *Cell*, 2011; 146: 980-991).

Armstrong SM *et al.*, Endothelial activation and dysfunction in the pathogenesis of influenza A virus infection, *Virulence*, 2013; 4(6): 537-542, revisan la evidencia en apoyo de la activación y disfunción endotelial como una característica central que precede al desarrollo de la gripe grave.

5 Usando micromatrices de expresión génica para comparar los perfiles transcriptómicos de pacientes infectados por gripe con síntomas graves, moderados y leves con pacientes febriles de etiología desconocida, Hoang *et al.* (Patient-based transcriptome-wide analysis identifies interferon and ubiquitination pathways as potential predictors of influenza A disease severity, *PLoS One* 2014, 9: e111640e) documentaron que los pacientes infectados por gripe, independientemente de sus resultados clínicos, tenían una inducción más fuerte de respuestas antivíricas y de citocinas y una atenuación más fuerte de las respuestas de linfocitos citolíticos naturales y de linfocitos T en comparación con aquellas con etiología desconocida y que la señalización de interferón y ubiquitinación estaba fuertemente atenuada en pacientes con los resultados más graves en comparación con aquellos con resultados moderados y leves. Esto concuerda con los propios datos de los inventores, que muestran niveles elevados de citocinas en suero de pacientes hospitalizados por gripe grave en relación con los individuos infectados por gripe sin gripe grave (véase el Ejemplo 5 a continuación).

20 Hoang *et al.*, 2014 descubrieron que la señalización de MAPK p38 está regulada positivamente en pacientes moderados y graves. MMP9, SOCS3, IFITMs, TLR10, RIG-I, CD244 y NCR3 se propusieron como genes candidatos para estudios posteriores. Sin embargo, es poco probable que el direccionamiento de citocinas individuales tenga los efectos antiinflamatorios amplios que se requieren, y la redundancia en el sistema de respuesta inflamatoria significa que es probable que se requiera eliminar múltiples citocinas simultáneamente para que una terapia sea eficaz.

25 El documento US 2010/0151042 A1 (Liang *et al.*) reivindica un método para reducir la gravedad, intensidad o duración de las complicaciones o síntomas asociados con una infección por gripe, en donde el método comprende diagnosticar a un sujeto con la infección por gripe; y administrar de manera simultánea al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de cisteamina y un segundo agente terapéutico vírico. Las complicaciones asociadas con la infección vírica de la gripe pueden incluir rinitis, infecciones bacterianas, complicaciones cardíacas, complicaciones neurológicas, miositis, insuficiencia renal, fibrosis pulmonar, empeoramiento del asma, empeoramiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, empiema o insuficiencia cardíaca. El segundo agente terapéutico vírico se puede seleccionar del grupo que consiste en: amantadina, rimantadina, ribavirina, idoxuridina, trifluridina, vidarabina, aciclovir, ganciclovir, foscarnet, zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina, famciclovir, oseltamivir fosfato, zanamivir, valaciclovir, antitusivos, mucolíticos, expectorantes, antipiréticos, analgésicos y descongestionantes nasales.

35 La terapia inmunomoduladora para la gripe grave ha sido revisada por Hui *et al.*, *Adjunctive Therapies and Immunomodulatory Agents in the Management of Severe Influenza*, *Antiviral Research*, 2013; 98: 410-416; Hui y Lee, *Adjunctive Therapies and Immunomodulatory Agents for Severe Influenza, Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2013; 7 (supl. 3): 52-59; y Liu *et al.*, *Cellular & Molecular Immunology*, 2015; 1-8, doi: 10.1038/cmi.2015.74.

40 Darwish *et al.*, *Immunomodulatory Therapy for Severe Influenza*, *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 2011 (julio); 9(7): 807-22, doi: 10.1586/eri.11.56, describen los determinantes de la patogenicidad del hospedador y del virus de la gripe, presentan la evidencia que respalda el uso de la terapia inmunomoduladora para atacar la respuesta inflamatoria del hospedador como un medio para mejorar el resultado clínico en la gripe grave, y revisan los datos experimentales sobre agentes inmunomoduladores en investigación dirigidos a la respuesta inflamatoria del hospedador en la gripe grave, incluida la terapia anti-TNF, estatinas, glucocorticoides, inhibidores de la ciclooxigenasa-2, macrólidos, agonistas del receptor activado por el proliferador de peroxisoma, agonistas de proteína quinasa activada por AMP y antagonistas del cuadro 1 del grupo de alta movilidad, concluyendo con una justificación para el uso de células estromales mesenquimales (madre) y terapia con angiopoyetina-1 contra las respuestas deletéreas del hospedador inducidas por la gripe que median la lesión y disfunción de órganos terminales.

50 Fedson DS, *Confronting an influenza pandemic with inexpensive generic agents: can it be done?*, *Lancet Infect. Dis.*, 2008; 8: 571-76, propone investigaciones para determinar si las estatinas, los fibratos, las cloroquinas y otros agentes genéricos podrían mitigar los efectos de una pandemia de gripe aviar A H5N1. Véase también Fedson DS, *Confronting the next influenza pandemic with anti-inflammatory and immunomodulatory agents: why they are needed and how they might work*, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2009; 3(4): 129-142, y Fedson DS, *Treating influenza with statins and other immunomodulatory agents*, *Antiviral Research*, 2013; 99(3): 417-435.

60 An SC *et al.*, *Triple combinations of neuraminidase inhibitors, statins and fibrates benefit the survival of patients with lethal avian influenza pandemic*, *Medical Hypotheses*, 2011; 77(6): 1054-157, plantean la hipótesis de que las estatinas y los fibratos, ambos, tienen efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores y otras múltiples actividades biológicas, pueden presentar efectos sinérgicos cuando se combinan con inhibidores de neuraminidasa para tratar las infecciones por virus A (H5N1) mediante la inhibición de la producción de mediadores inflamatorios tempranos (por ejemplo, muchas citocinas/quimiocinas) o del mediador tardío (por, proteína de caja de grupo de alta movilidad) 1), incluso mostrando las actividades antivíricas con la prevención del desarrollo de resistencia antivírica.

- Tal como lo describe Bermejo-Martin JF, *et al.*, Macrolides for the treatment of severe respiratory illness caused by novel H1N1 swine influenza viral strains, *J Infect Developing Countries*, 2009; 3(3): 159-161, los macrólidos son moléculas con actividad antibacteriana que también tienen propiedades notablemente antiinflamatorias. Ejercen efectos tanto estimulantes como inhibidores sobre los leucocitos. Estos efectos parecen estar relacionados con el estado de activación de los leucocitos, que facilita la eliminación de bacterias y resuelve la inflamación local. Se propone el uso de macrólidos en el tratamiento de enfermedades graves causadas por el nuevo reordenamiento del virus de la gripe porcina H1N1, particularmente en combinación con antiviricos, para reducir la respuesta inflamatoria sistémica que lleva a neumonía y a la muerte.
- Sato K *et al.*, Therapeutic Effect of Erythromycin on Influenza Virus-induced Lung Injury in Mice, *Am J Respir Crit Care Med*, 1998; 157: 853-857, evaluó el uso de eritromicina (EM), un antibiótico con potentes efectos antiinflamatorios que se utiliza para tratar infecciones crónicas del tracto respiratorio inferior, sobre la neumonía inducida por el virus de la gripe en ratones. Se descubrió que la administración de EM a una dosis de 3,3 mg/kg/día (por vía intraperitoneal, desde los días 1-6 después de la infección) mejoró significativamente la tasa de supervivencia de los ratones infectados con el virus de la gripe y la tasa de supervivencia de los ratones infectados por el virus en el día 20 de la infección aumentaron de manera dependiente de la dosis con la EM administrada a los animales, del 14 % entre los controles al 42 % entre los animales que recibieron EM a 1,0 mg/kg/día y el 57 % entre los que recibieron EM a 3,3 mg/kg/día.
- Börgeling *et al.*, Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection, *J Biol Chem*. 3 de enero de 2014;289(1):13-27, describe el uso de SB 202190, un inhibidor de MAPK p38, para controlar la señalización del interferón en las primeras etapas de la infección por gripe y la supresión resultante de la expresión excesiva de citocinas. SB 202190 se administra al mismo tiempo que la exposición al virus. Los efectos de la infección vírica concomitante con la administración de SB 202190 se analizan hasta 2 días después de la infección en ratones infectados por gripe. Los datos se limitan a los efectos de SB 202190 sobre la expresión de citocinas cuando se administra al inicio de la infección por el virus de la gripe (es decir, concomitante con la exposición al virus). Los efectos de la primera administración de SB 202190 en los momentos posteriores a la exposición al virus no se investigan y los efectos de SB 202190 una vez que se ha alcanzado el punto crítico (o punto de inflexión) y la respuesta de las citocinas se vuelve exagerada y excesiva ciertamente no se consideran.

En el momento de la presente invención, sin embargo, sigue existiendo una necesidad insatisfecha de tratamiento para la gripe grave.

35 **Sumario de la invención**

Tal como se describe a continuación, especialmente con referencia a los Ejemplos, los inventores han descubierto que la MAP quinasa p38 está regulada positivamente en varias vías de señalización celular que son muy activas en pacientes con gripe grave en comparación con pacientes con gripe leve o moderada. En particular, se ha descubierto que la MAP quinasa p38 está involucrada en una serie de diferentes vías de señalización no metabólicas que comprenden más de tres nodos, en la cual el 100 % de los nodos están regulados positivamente en pacientes con gripe severa frente a pacientes con gripe leve, y al menos el 75 % de los nodos están regulados positivamente en pacientes con gripe severa frente a pacientes con infección por H1N1 o gripe moderada.

La MAP quinasa p38 es un nodo que se encuentra en una parte alta de una cascada de señalización en una variedad de tipos de células (epiteliales, endoteliales e inmunitarias) que son importantes en la patología de la gripe grave. Debido a la naturaleza rápida y progresiva de la gripe grave, se requiere el direccionamiento hacia una proteína alta en una cascada de señalización para atenuar la producción de mediadores inflamatorios rápidamente y reducir la progresión de la enfermedad.

Sin embargo, aunque los inventores identificaron muchos otros nodos diana en 95 rutas como posibles dianas para el tratamiento de la gripe grave, se descubrió inesperadamente que los inhibidores de la MAP quinasa p38 presentan un efecto de reducción de la expresión dependiente de la dosis sobre la liberación de citocinas, particularmente IP10, de células endoteliales tratadas con un medio condicionado vírico que simula la acción de mediadores inflamatorios producidos a partir de células epiteliales infectadas por gripe, mientras que otras posibles dianas prometedoras no muestran el mismo efecto. En particular, tal como se desvela en el Ejemplo 4 a continuación, mientras que los inhibidores de la MAP quinasa p38 presentan una inhibición dependiente de la dosis de IP10 en las células endoteliales, así como efectos inhibidores sobre la liberación de mediadores inflamatorios de las células inmunitarias que son comparables con los corticosteroides y macrólidos, la siguiente diana más prometedora, a saber, la proteína quinasa activada por mitógenos (MEK), no es eficaz para inhibir la liberación de IP10 de las células endoteliales y, de hecho, parece aumentar los niveles de IP10 a concentraciones de fármaco más altas.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, por lo tanto, se proporciona un inhibidor de MAPK p38 para su uso en el tratamiento de la gripe grave en un paciente humano; en donde la gripe grave se caracteriza por síntomas que persisten o reaparecen durante más de 2 días sin signos de resolución, y el inhibidor de la MAP quinasa p38 inhibe la liberación de mediadores proinflamatorios de las células endoteliales e inhibe la liberación de citocinas

proinflamatorias de células inmunitarias.

En algunas realizaciones, la gripe grave se puede caracterizar por síntomas que persisten o reaparecen durante más de 3, 4, 5 o más días sin signos de resolución. Los síntomas que persisten o reaparecen pueden incluir fiebre (es decir, una temperatura superior a 100 °F/38 °C), letargo, dolor, congestión, tos, congestión nasal, secreción nasal o congestión o inflamación de las vías respiratorias superiores.

Más específicamente, el inhibidor de la MAP quinasa p38 se puede usar para el tratamiento de la gripe grave en un paciente humano inhibiendo la liberación de citocinas proinflamatorias de las células endoteliales.

En algunas realizaciones, se puede utilizar el inhibidor de la MAP quinasa p38, de conformidad con la presente invención, para el tratamiento de la gripe grave en un paciente humano mediante la inhibición de la liberación de IP10 de las células endoteliales.

De manera ventajosa, el inhibidor de la MAP quinasa p38 puede presentar una inhibición dependiente de la dosis de la liberación de citocinas de las células endoteliales.

Además de sus efectos inhibidores sobre la liberación de citocinas de las células endoteliales, el inhibidor de la MAP quinasa p38 también actúa para inhibir la liberación de citocinas proinflamatorias de las células inmunitarias, que normalmente se encuentran cerca de las células endoteliales en el tracto respiratorio inferior.

En el presente documento, "gripe grave" significa una enfermedad causada por cualquier virus de la gripe y que lleva a una enfermedad clínica del tracto respiratorio inferior y/o inflamación del tracto respiratorio inferior y/o hipercitocinemia (por ejemplo, pulmonar o sistémica). Tal como se ha descrito anteriormente, la gripe grave es distinta de la gripe no complicada (leve o moderada) en la que el paciente suele presentar síntomas de las vías respiratorias superiores e inferiores clínicamente tolerables, tales como, por ejemplo, congestión nasal, estornudos, rinorrea, pirexia (fiebre) y tos y producción de esputo, y de la cual un paciente normalmente se recupera de forma natural sin necesidad de intervención terapéutica. En la gripe grave, la respuesta inflamatoria del paciente a la infección vírica es muy exagerada o extendida, y el paciente desarrolla síntomas del tracto respiratorio más graves o complicaciones clínicas que pueden requerir hospitalización y, en ocasiones, provocar la muerte. En tales casos, la intervención terapéutica temprana es de vital importancia. Tal como lo indica la definición de la OMS de gripe grave, una amplia gama de complicaciones pueden ser causadas por la infección por el virus de la gripe del tracto respiratorio superior (conductos nasales, senos nasales, garganta) y tracto respiratorio inferior (pulmones). Por lo tanto, diferentes pacientes con gripe grave pueden presentar una amplia gama de diferentes síntomas o signos de la enfermedad. Los diversos síntomas o signos que se describen a continuación que son característicos de la gripe grave pueden ser observables o detectables después de 2 días de enfermedad; normalmente, dentro de los 2-9 días de enfermedad.

Por ejemplo, la gripe grave se puede caracterizar por hipercitocinemia. Normalmente, la hipercitocinemia puede implicar niveles elevados de una o más citocinas.

En algunas realizaciones, las citocinas pueden comprender una o más de IL-8, IL-7, IL-6, Eotaxina, IP10, MCP1, MCP4 y VEGF. En particular, en algunas realizaciones, las citocinas pueden comprender una o más de IL-8, Eotaxina, IP10 e IL-7.

En algunas realizaciones, las citocinas pueden comprender una o más de IL-6, IL-8 e IP10 (véase Lee N. *et al.*, 2011; Lee N. *et al.*, Viral clearance and inflammatory response patterns in adults hospitalised for pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus pneumonia, *Antiviral Therapy*, 2011; 16: 237-47).

En algunas realizaciones, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IL-6 de más de aproximadamente 1,5 o 2 veces su intervalo de referencia en plasma (<3,1 pg/ml), en algunas realizaciones mayor de aproximadamente 10, 15 o 30 veces, hasta unas 54 veces o más. Por lo tanto, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IL-6 superior a aproximadamente 4,7 pg/ml. Más particularmente, la hipercitocinemia implica un nivel elevado de IL-6 superior a aproximadamente 4,7 pg/ml en el caso de la gripe estacional y superior a aproximadamente 7,8 pg/ml en el caso de la gripe pandémica.

En algunas realizaciones, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IL-8 de más de aproximadamente 1 o 2 veces su intervalo de referencia en plasma (<5,0 pg/ml), en algunas realizaciones mayor de aproximadamente 4 veces, hasta aproximadamente 8, 10 o 12 veces o más. Por lo tanto, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IL-8 superior a aproximadamente 5,0 pg/ml. Más particularmente, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IL-8 superior a aproximadamente 5,0 pg/ml en el caso de la gripe estacional y superior a aproximadamente 11,6 pg/ml en el caso de la gripe pandémica.

En algunas realizaciones, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IP-10 de más de aproximadamente 1 o 2 veces su intervalo de referencia en plasma (202-1480 pg/ml), en algunas realizaciones mayor de 1,1 veces, más de 1,5 veces o más de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces, hasta aproximadamente 10, 20 o 30 veces o

más. Por lo tanto, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IP-10 superior a aproximadamente 835 pg/ml. Más particularmente, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IP-10 superior a aproximadamente 835 pg/ml en el caso de la gripe pandémica y superior a aproximadamente 1476 pg/ml en el caso de la gripe estacional.

5 En algunas realizaciones, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de MCP-1 de más de aproximadamente 1 o 2 veces su intervalo de referencia en plasma (<10,0-57,0 pg/ml), en algunas realizaciones mayor de aproximadamente 4 veces, hasta unas 5,5 veces o más. Por lo tanto, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de MCP-1 superior a aproximadamente 52,9 pg/ml. Más particularmente, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de MCP-1 superior a aproximadamente 52,9 pg/ml en el caso de la gripe pandémica y superior a aproximadamente 64,8 pg/ml en el caso de la gripe estacional.

15 En algunas realizaciones, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de sTNFR-1 de más de aproximadamente 1 o 2 veces su intervalo de referencia en plasma (484-1407 pg/ml), hasta unas 2,5 veces o más. Por lo tanto, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de sTNFR-1 superior a aproximadamente 1099,4 pg/ml. Más particularmente, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de sTNFR-1 superior a aproximadamente 1099,4 pg/ml en el caso de la gripe estacional y superior a aproximadamente 1250,7 pg/ml en el caso de la gripe pandémica.

20 En algunas realizaciones, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de MIG de más de aproximadamente 1 o de 2 veces su intervalo de referencia en plasma (48,0-482,0 pg/ml), en algunas realizaciones mayor de 1,1 veces, mayor de 1,5 veces o mayor de 2 veces, hasta aproximadamente 15, 40 o 50 veces o más. Por lo tanto, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de MIG superior a aproximadamente 103,8 pg/ml. Más particularmente, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de MIG superior a aproximadamente 103,8 pg/ml en el caso de la gripe estacional y superior a aproximadamente 118,7 pg/ml en el caso de la gripe pandémica.

30 En algunas realizaciones, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IL-17A de más de aproximadamente 1, 1,5 o 2 veces su intervalo de referencia en plasma (<10,0 pg/ml); en algunas realizaciones, mayor de 4 veces, mayor de 5 veces o mayor de 6 veces, hasta unas 7 veces o más. Por lo tanto, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IL-17A superior a aproximadamente 5,0 pg/ml. Más particularmente, la hipercitocinemia puede implicar un nivel elevado de IL-17A superior a aproximadamente 5,0 pg/ml en el caso de la gripe pandémica y superior a aproximadamente 9,3 pg/ml en el caso de la gripe estacional.

35 La gripe grave se puede caracterizar en algunas realizaciones por la activación sostenida de las citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, IP10, MCP-1 y/o sTNFR-1).

40 Se pueden detectar niveles de citocinas en la sangre completa del paciente, suero, plasma, lavado nasal, secreciones nasales o lavado alveolar bronquiolar. Los niveles de citocinas se pueden cuantificar usando cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la técnica. Convenientemente, se puede utilizar un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o clasificación celular automatizada fluorescente (FAC). A modo de ejemplo, un sistema de inmunoensayo quimioluminiscente tal como, por ejemplo, el que está disponible en Meso Scale Diagnostics LLC (<http://web.archive.org/web/20160522190937/https://www.mesoscale.com/>) se puede emplear por su velocidad y sensibilidad.

45 Además, o como alternativa, la gripe grave puede ir acompañada de recuentos totales de glóbulos blancos significativamente más altos. Un paciente con gripe grave puede tener recuentos absolutos de neutrófilos significativamente más altos que un paciente con gripe leve o moderada. Normalmente, un paciente con gripe grave después de 2-9 días de enfermedad puede tener un recuento de neutrófilos en el intervalo de 2,1-24,5 x 10³/μl (en comparación con un paciente con gripe moderada después de 1-9 días de enfermedad que puede tener un recuento de neutrófilos en el intervalo de 0,62-10,88 x 10³/μl o un paciente con gripe leve después de 3-8 días de enfermedad que puede tener un recuento de neutrófilos en el intervalo de 0,5-6,5 x 10³/μl). En algunas realizaciones, el recuento absoluto de plaquetas puede ser significativamente menor en pacientes con enfermedad grave después de 2-9 días de enfermedad, por ejemplo, 27-250 x 10³/μl (en comparación con un paciente con gripe moderada después de 1-9 días de enfermedad que puede tener un recuento de plaquetas en el intervalo de 55-345 x 10³/μl o un paciente con gripe leve después de 3-8 días de enfermedad que puede tener un recuento de plaquetas en el intervalo de 79-370 x 10³/μl) (Hoang *et al.*, 2014).

60 Además, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por síntomas o signos de hipoxemia o insuficiencia cardiopulmonar. En algunas realizaciones, el paciente puede tener una saturación de oxígeno arterial de ≤ 92 % en aire ambiente por un método transcutáneo. Normalmente, los síntomas o signos de hipoxemia o insuficiencia cardiopulmonar pueden incluir uno o más de disnea, taquipnea, cianosis, presión arterial baja (designada como por debajo del intervalo normal para la edad y el sexo) y taquicardia.

65 En algunas realizaciones, el paciente puede tener taquipnea (frecuencia respiratoria ≥ 30 para edades ≥ 12 años, frecuencia ≥ 40 para edades de 6 a 12 años, frecuencia ≥ 45 para edades de 3 a 6 años, frecuencia ≥ 50 para edades de 1 a 3 años).

En algunas realizaciones, el paciente puede tener o mostrar signos de malestar al respirar o disnea (incapacidad para pronunciar frases completas, parecer sin aliento, utilizar músculos respiratorios accesorios).

- 5 Además, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por una comorbilidad con un trastorno de las vías respiratorias bajas con o sin infiltrados pulmonares radiológicos.

- 10 Además, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por síntomas o signos que sugieren trastornos neuromusculares periféricos y/o del SNC, tales como, por ejemplo, encefalitis, mielitis o rabdomiólisis, incluido el estado mental alterado, inconsciencia, somnolencia, dificultad para despertar, convulsiones recurrentes, confusión, mialgia, debilidad grave, parálisis y anomalías sensoriales (por ejemplo, hormigueo en las extremidades, pérdida de la sensación normal de dolor).

- 15 Aún más, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por una deshidratación grave. La OMS define la deshidratación grave en adultos como una pérdida de peso corporal > 9 % (en niños > 15 %) (K. Sinha y M. Davenport (eds.), *Handbook of Pediatric Surgery*, doi: 10.1007/978-1-84882-132-3_2.1, Springer-Verlag London Limited 2010). De acuerdo con la presente invención, la gripe grave puede implicar pérdida de líquidos corporales > 9 %, por ejemplo 10-15%.

- 20 Además, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por niveles anómalos de fatiga y/o letargo.

Además, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por la presencia de un infiltrado pulmonar radiológico.

- 25 Aún más, o como alternativa, la gripe grave implica evidencia de infección o replicación vírica sostenida. En algunas realizaciones, el paciente puede presentar más de 2 días de replicación vírica constante o creciente que puede ser analizada usando métodos de laboratorio convencionales o diagnosticada mediante la identificación de síntomas persistentes o que empeoran. En algunas realizaciones, el paciente puede presentar 3, 4, 5 o más días de replicación vírica constante o en aumento.

- 30 Además, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por una infección bacteriana secundaria.

Además, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por un trastorno del tracto respiratorio inferior o una inflamación.

- 35 Además, o como alternativa, la gripe grave se puede caracterizar por insuficiencia de un órgano o multiorgánica (por ejemplo, insuficiencia respiratoria o insuficiencia renal) o choque séptico.

- 40 En algunas realizaciones, el paciente puede ser un bebé (es decir, menos de un año) o un anciano (es decir, 65 años o más) o puede ser una mujer embarazada.

En algunas realizaciones, el paciente humano puede tener una o más comorbilidades subyacentes que predisponen al paciente a una gripe grave.

- 45 Por ejemplo, el paciente puede estar inmunodeprimido o puede padecer EPOC, anemia genética grave, asma o diabetes, insuficiencia hepática o renal crónica, obesidad o un trastorno o afección cardiovascular.

Descripción detallada de la invención

- 50 Los inhibidores de la MAP quinasa p38 son una clase establecida de agentes activos (véase, por ejemplo, Zarubin y Han, *Cell Research* (2005) 15, 11-18. doi: 10.1038/sj.cr.7290257). Los expertos en la técnica disponen de una amplia gama de inhibidores de la MAP quinasa p38 (véase, por ejemplo, Lee, *et al.*, Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy, *Immunopharmacol.*, 2000; 47(2-3): 185-201. doi: 10.1016/S0162-3109(00)00206-X).

- 55 Los ejemplos de inhibidores de la MAP quinasa p38 de bajo peso molecular incluyen piridinilimidazoles, pirazoles sustituidos, derivados de pirazolopiridina, piridilos sustituidos, derivados de quinazolina, arilureas, análogos de heteroarilo, compuestos de imidazol sustituidos y compuestos de triazol sustituidos. (Véase Young P.R. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 12116-12121 y Bender, P.E., *J. Med. Chem.* 1985, 28; 1169-1177).

- 60 Los ejemplos de piridinilimidazoles capaces de inhibir p38 incluyen 6-(4'-fluorofenil)-5-(4'-piridil)-2,3-dihidroimidazo(2,1-b)-tiazol y un metabolito del mismo (sulfóxido, sulfona), análogo del mismo, fragmento del mismo y mimético del mismo. Adicionalmente, se propone que el 4-(piridin-4-il)-5-fenilimidazol, la estructura más pequeña de los piridinilimidazoles, podría ser suficiente para inhibir la p38 (véase Gallagher, TF *et al.*, *Bio-org. Med. Chem.*, 1997; 5: 49-64).

- 65 También se proponen compuestos de pirazol sustituidos con 1,5-diarilo particulares como inhibidores de la MAP

quinasa p38. Dichos compuestos de pirazol sustituidos se desvelan en el documento US 6.509.361 B. Otros derivados del pirazol que inhiben la p38 se desvelan en el documento US 6.335.336 B.

También se proponen derivados de pirazolopiridina particulares como inhibidores de la MAP quinasa p38. Dichos derivados de pirazolopiridina se desvelan en el documento WO 2004/076450 A1. En algunas realizaciones, el inhibidor de la MAP quinasa p38 para su uso de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar de 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina; 4,6-difenil-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 5-(4-piridil)-4,6-bis[3-(trifluorometil)fenil]-1H-pirazolo[3,4-d]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-3-metil-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 3-metil-4,6-difenil-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 2-etil-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-etil-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2,3-dimetil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1,3-dimetil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-[2-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]etil]-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-[2-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]etil]-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]-4,6-bis(4-fluorofenil)-3-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]-4,6-bis(4-fluorofenil)-3-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-(3-cloropropil)-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-(3-cloropropil)-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol; 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]propan-1-ol 2-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-metil-4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-metil-4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo [3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-2-[2-(tetrahidropiran-2-iloxi)etil]pirazolo[3,4-b]piridina 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]etanol; 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfanilbencil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1-(4-metilsulfanilbencil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]etil]-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]etil]-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[2-(morfolin-4-il)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1-[2-(morfolin-4-il)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridinaetil 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]acetato; etil 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]acetato; etil 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propionato; etil 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]propionato; 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-(4-piperidil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1-(4-piperidil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-(4-piperidil)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina; 4,6-bis(6-cloropiridin-3-il)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-3-metil-2-(4-piperidil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-3-metil-1-(4-piperidil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4- σ]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[2-(4-piperidil)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina ácido 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]acético ácido 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]acético ácido 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propiónico; ácido 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]propiónico; 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]-1-(morfolin-4-il)etanonona 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]acetamida 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]-1-(morfolin-4-il)etanonona 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]-1-(morfolin-4-il)propan-1-ona 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]-N-propilpropionamida 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]-1-(morfolin-4-il)propan-1-ona 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfanilfenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1-(4-metilsulfanilfenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilbencil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1-(4-metilsulfonilbencil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1-(4-metilsulfonilbencil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 3-cloro-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 3-bromo-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina-3-carbonitrilo 3-bromo-4,6-bis(4-fluorofenil)-1-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina-3-carbonitrilo 3-bromo-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina N-metil-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propil]amina[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]metanol 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]-N,N-dimetilacetamida 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]-N,N-dimetilacetamida 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[2-(2-metoxietoxi)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-1-[2-(2-metoxietoxi)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[3-(morfolin-4-il)propil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(6-cloropiridin-3-il)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(6-cloropiridin-3-il)-1-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(6-cloropiridin-3-il)-3-metil-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(6-metilpiridin-3-il)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-(2-ftalimidoetil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-(2-aminoetil)-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etanol 6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-

b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-(3-ftalimidopropil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]acetaldehído 2-(3-aminopropil)-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina;N-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-ilmetil]-1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidina-4-carboxamida N-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-ilmetil]-1H-piperidina-4-carboxamida 2-(3-benciloxipropil)-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina; 1-(3-benciloxipropil)-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina N,N-dietil-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amina N,N-dietil-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]etil]amina 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-2-(3-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1-piridin-3-ilmetilpirazolo[3,4-b]piridina N,N-dimetil-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propil]amina N,N-dimetil-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]propil]amina 1-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]piperidin-4-ol 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]-2-hidroxiopropan-1-ol 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]-2-hidroxiopropan-1-ol 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-2-(4-piridilmetil)pirazolo[3,4-b]piridina; 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1-(4-piridilmetil)pirazolo[3,4-b]piridina N-(*terc*-butoxicarbonil)-[1-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propil]piperidin-4-il]amina 2-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 3-metil-4,6-bis(6-metilpiridin-3-il)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 1-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]-propil]piperidin-4-ona N-(*terc*-butoxicarbonil)-[1-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]piperidin-4-il]amina N-metil-[1-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]pi peridin-4-il]amina[1-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propil]piperidin-4-il]amina 2-[1-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]piperidin-4-il]etanol[1-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]piperidin-4-il]amina 6-(4-fluorofenil)-2-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-1-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 3-amino-5-[2-(metilsulfanil)pirimidin-4-il]-6-[3-(trifluorometil)fenil]-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 2-[3-[1-(4-*terc*-butoxicarbonil)piperazin-1-il]propil 3-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[3-(1-piperazin-1-il)propil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 5-[2-(metilsulfanil)pirimidin-4-il]-6-[3-(trifluorometil)fenil]-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 5-[2-(metilsulfonil)pirimidin-4-il]-6-[3-(trifluorometil)fenil]-1H-pirazolo[3,4-b]piridina (1S)-N-(1-feniletil)-[4-[6-[3-(trifluorometil)fenil]-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina 1-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propil]piperidin-4-ol 2-[1-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propil]piperidin-4-il]etanol 4,6-bis(4-fluorofenil)-3-(4-piridil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina-3-carbonitrilo 2-[2-[[1-(*terc*-butoxicarbonil)piperidin-4-il]amino]etil]-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[2-[(4-piperidil)amino]etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina N-(2-metoxietil)-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amina 1-[4-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]piperazin-1-il]etanona 3-[4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-1-il]propan-1-ol 2-etil-4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-etil-4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-difenil-2-(2-ftalimidoetil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-(2-aminoetil)-4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 2-alil-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-alil-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 1-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]piperidin-4-ona 3-aminometil-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 3-amino-6-(4-fluorofenil)-4-metil-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina; 3-[N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amino]propan-1-ol N-etil-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amina 2-[N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amino]etanol N-[(2-piridil)metil]-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amina N-[(2-tienil)metil]-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amina 1-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]piperidina-4-carboxamida 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[2-(pirrolidin-1-il)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina (3R)-1-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]pirrolidin-3-ol 2-[N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]-N-metilamino]etanol 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-2-[2-(1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-il)etil]pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[2-(4-fenilpiperazin-1-il)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[2-[4-(1-piperidil)piperidin-1-il]etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 3-[N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]-N-metilamino]propiononitrilo N-metil-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amina 2-[2-[4-(*terc*-butoxicarbonil)piperazin-1-il]etil]-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-2-[2-(piperazin-1-il)etil]-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-2-vinilpirazolo[3,4-b]piridina 2-[N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]-N-(2-hdroxietil)amino]etanol N-ciclopropil-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]amina N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]acetamida N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]-n'-isopropilurea N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]metanosulfonamida 6-(4-fluorofenil)-4-(4-piperidil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-(2-furil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-(1H-imidazol-4-il)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4-(5-bromotien-2-il)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina; 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfanil)pirimidin-4-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 5-(2-cloropiridin-4-il)-4,6-bis(4-fluorofenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-(2-feniletil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4-(6-cloropiridin-3-il)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina; 4-(3,4-diclorofenil)-1-etil-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-(1-metilpiperidin-4-il)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 3-amino-6-(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfanil)pirimidin-4-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfanil)pirimidin-4-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-difenil-5-(4-piridil)-2-[2-(tetrahidropiran-2-il)etil]pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-(2-furil)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-2-metil-4-(1-metil-1H-imidazol-4-il)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfanil)pirimidin-4-il)-2-[2-(tetrahidropiran-2-il)etil]pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-

fluorofenil)-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-2-[3-(tetrahidropiran-2-iloxi)propil]pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-
 fluorofenil)-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-2-[3-(tetrahidropiran-2-iloxi)propil]pirazolo[3,4-b]piridina 4-(5-bromotien-2-il)-
 6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-
 il)pirazolo[3,4-b]piridina 5-(2-cloropiridin-4-il)-4,6-bis(4-fluorofenil)-2-metilpirazolo[3,4-b]piridina; 6-(4-fluorofenil)-4-(2-
 feniletil)-5-(4-piridil)-2-[3-(tetrahidropiran-2-iloxi)propil]pirazolo[3,4-b]piridina 4-(6-cloropiridin-3-il)-6-(4-fluorofenil)-5-
 5 (4-piridil)-2-[3-(tetrahidropiran-2-iloxi)propil]pirazolo[3,4-b]piridina 4-(6-cloropiridin-3-il)-6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-2-[3-(tetrahidropiran-2-iloxi)propil]pirazolo[3,4-b]piridina 6-(3-
 trifluorometilfenil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)-4-[5-(3-piridil)tien-2-il]pirazolo[3,4-
 b]piridina 2-[4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etanol 3-[5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-6-(3-
 10 trifluorometilfenil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 2-[6-(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)pirazolo[3,4-
 b]piridin-2-il]etanol 3-[6-(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[4,6-bis(4-
 fluorofenil)-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[6-(4-fluorofenil)-4-(2-feniletil)-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[4-(6-cloropiridin-3-il)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-
 il]propan-1-ol 6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(2-metilsulfonilpirimidin-4-il)pirazolo[3,4-b]piridina 3-[5-(2-
 15 metilsulfonilpirimidin-4-il)-6-(3-trifluorometilfenil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 2-[6-(4-fluorofenil)-5-(2-
 metilsulfonilpirimidin-4-il)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etanol 3-[6-(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfonilpirimidin-4-il)pirazolo[3,4-
 b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfonilpirimidin-4-il)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol N-
 ciclopropilmetil-[4-[6-(3-trifluorometil)fenil]-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina(1S)-3-[5-[2-(1-
 feniletilamino)pirimidin-4-il]-6-(3-trifluorometilfenil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol N-ciclopropilmetil-[4-[6-(4-
 20 fluorofenil)-2-metil-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina 2-[5-[2-[(ciclopropilmetil)amino]pirimidin-4-il]-6-(4-
 fluorofenil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etanol 3-[5-[2-[(ciclopropilmetil)amino]pirimidin-4-il]-6-(4-fluorofenil)pirazolo[3,4-
 b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[5-[2-[(ciclopropilmetil)amino]pirimidin-4-il]-4,6-bis(4-fluorofenil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-
 il]propan-1-ol 4-[4-[4,6-bis(4-fluorofenil)-2-metilpirazolo[3,4-b]piridin-5-il]piridin-2-ilamino]bencenosulfonamida 4,6-
 25 bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-3-ol 6-(4-fluorofenil)-4-(3H-imidazol-4-il)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-
 b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-(1H-pirazol-3-il)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 3-[6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-
 pirazolo[3,4-b]piridin-4-il]fenol 4-ciclopropil-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-
 (5-metilfuran-2-il)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4-(5-bromofuran-2-il)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-
 pirazolo[3,4-b]piridina 4-(4-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-5-pirimidin-4-il-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4-(4-
 30 benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-propil-5-(4-
 piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4-(3-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1 H-pirazolo[3,4-b]piridina 5-(2-
 cloropiridin-4-il)-6-(4-fluorofenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4-[6-(4-flubrofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-4-
 il]butan-1-ol 4-bencil-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4-(4-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-
 35 piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-pirimidin-4-il-1H-pirazolo[3,4-b]piridina[2(S)-2-[4,6-bis(4-
 fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]pirrolidina-2-carboxamida 2-[2-(4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-
 b]piridin-2-il)etilamino]etanol 6-(4-fluorofenil)-2-metil-4-(3-piridil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-3-
 metil-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 3-amino-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-6-fenil-1H-
 pirazolo[3,4-b]piridina 5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-6-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-4-metil-5-(2-
 40 metilsulfanilpirimidin-4-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina 5-(2-metoxipirimidin-4-il)-6-(3-trifluorometilfenil)-1H-pirazolo[3,4-
 b]piridina; N-[2-[4,6-(difenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]acetamida N-[3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propil]acetamida N-[2-(4,6-difenil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il)etil]-N-(2-
 hidroxietil)acetamida N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]propionamida N-[3-[4,6-bis(4-
 45 fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propil]metanosulfonamida 5-(2-aminopirimidin-4-il)-6-(3-
 trifluorometilfenil)-1-ri-pirazolo[3,4-b]piridina N-[5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-6-(3-trifluorometilfenil)-1H-pirazolo[3,4-
 b]piridin-3-il]acetamida N-ciclopropilmetil-[4-[3-benciloxycarboxilamino-6-(3-trifluorometilfenil)-1H-pirazolo[3,4-
 b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]-2-hidroxiacetamida
 N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]piperidina-4-carboxamida N-[2-[4,6-bis(4-
 50 fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]-2-(metilamino)acetamida N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etil]-2-(2-hidroxietilamino)acetamida N-[2-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-
 b]piridin-2-il]etil]nicotinamida 4-(4-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-
 fluorofenil)-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-2-metilpirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-2,4-dimetil-5-(4-
 55 piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4-(4-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)pirazolo[3,4-
 b]piridina 2-(1-bencilpirrolidin-2-ilmetil)-4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4-(4-benciloxifenil)-6-(4-
 fluorofenil)-2-metil-5-pirimidin-4-ilpirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-2-metil-4-(5-metilfuran-2-il)-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4-(5-bromofuran-2-il)-6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-
 60 fluorofenil)-2-metil-4-propil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4-(3-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 6-(4-fluorofenil)-2-metil-4-(2-feniletil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 5-(2-cloropiridin-4-
 il)-6-(4-fluorofenil)-2-metilpirazolo[3,4-b]piridina 4-bencil-6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridina 4-
 [6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-4-il]butan-1-ol; 4-[6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-4-il]fenol N-[6-(4-fluorofenil)-5-(2-metilsulfanilpirimidin-4-il)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-
 65 il]acetamida N-[5-[2-[(ciclopropilmetil)amino]pirimidin-4-il]-6-(4-fluorofenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-il]acetamida 3-
 [6-(4-fluorofenil)-4-(2-furil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 2-[4-(4-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]etanol 3-[4-(4-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-
 il]propan-1-ol 3-[6-(4-fluorofenil)-4-(5-metilfuran-2-il)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[4-ciclopropil-
 6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[4-(5-bromotien-2-il)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-
 piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[6-(4-fluorofenil)-4-propil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol
 3-[4,6-bis(4-fluorofenil)-5-pirimidin-4-ilpirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[4-(3-benciloxifenil)-6-(4-fluorofenil)-5-(4-

piridil]pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol 3-[4-bencil-6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-2-il]propan-1-ol(1S)-N-(1-feniletil)-[4-[6-(4-fluorofenil)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina N-ciclopropilmetil-[4-[6-(4-fluorofenil)-3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina 1-[4-[6-(4-fluorofenil)-2-metilpirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-ilamino]propan-2-ol N-ciclopropilmetil-[4-[6-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina 2-[4-[6-(4-fluorofenil)-2-metilpirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-ilamino]propan-1-ol 4-[4-[6-(4-fluorofenil)-2-metil-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-ilamino]butan-1-ol(1S)N-(1-feniletil)-[4-[6-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina N-(3-metoxipropil)-[4-[6-(3-trifluorometilfenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina 3-[4-[6-(3-trifluorometilfenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-ilamino]propan-1-ol 3-[4-[6-(4-fluorofenil)-2-(3-hidroxiopropil)pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-ilamino]propan-1-ol N-etil-[4-[6-(3-trifluorometilfenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina N-bencil-[4-[6-(3-trifluorometilfenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il]pirimidin-2-il]amina 4-[5-[2-[(ciclopropilmetil)amino]pirimidin-4-il]-6-(4-fluorofenil)-2-metilpirazolo[3,4-b]piridin-4-il]fenol 4-[6-(4-fluorofenil)-2-(3-hidroxiopropil)-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-4-il]fenol 4-[6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-pirimidin-4-il]pirazolo[3,4-b]piridin-4-il]fenol 3-[6-(4-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)pirazolo[3,4-b]piridin-4-il]fenol 4,6-bis(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-2-(pirrolidin-2-ilmetil)pirazolo[3,4-b]piridina 4-[4-[6-(4-fluorofenil)-2-metilpirazolo[3,4-b]piridin-5-il]piridin-2-ilamino]bencenosulfonamida N-[5-[2-[(ciclopropilmetil)amino]pirimidin-4-il]-6-(4-fluorofenil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-il]acetamida 7-óxido; y N-[6-(4-fluorofenil)-5-(4-piridil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-il]isonicotinamida; o una sal, solvato o profármaco de los mismos.

Los ejemplos de otros inhibidores de la MAP quinasa p38 incluyen piridilos sustituidos tales como los desvelados en el documento US 2003/0139462 A.

Otros inhibidores de la MAP quinasa p38 son los desvelados en el documento US 6.610.688 B.

Un derivado de quinazolina también puede funcionar como inhibidor de la MAP quinasa p38. Ejemplos de derivados de quinazolina como inhibidores de la MAP quinasa p38 se desvelan en los documentos US 6.541.477 B, US 6184226 B, US 6.509.363 B y US 6.635.644 B.

Las arilureas y los análogos de heteroarilo también pueden funcionar como inhibidores de la MAP quinasa p38. En el documento US 6.344.476 B se desvelan ejemplos de arilureas y análogos de heteroarilo tales como inhibidores de la MAP quinasa p38. El documento WO 99/32110 A describe heteroanillo-ureas como inhibidores de la MAP quinasa p38. El documento WO 99/32463 A describe compuestos de urea que inhiben la quinasa p38. El documento WO 98/52558 A describe compuestos de urea para la inhibición de la quinasa p38. El documento WO 99/00357 A describe un método para usar compuestos de urea como inhibidores de la quinasa p38. El documento WO 99/58502 A describe compuestos de urea como inhibidores de la quinasa p38.

Un compuesto de imidazol sustituido y un compuesto de triazol sustituido también pueden funcionar como inhibidores de p38. Dichos compuestos se desvelan en los documentos US 6.560.871 B y US 6.599.910 B, respectivamente.

Ejemplos específicos de inhibidores de la MAP quinasa p38 incluyen 2-(4-Clorofenil)-4-(fluorofenil)-5-piridin-4-il-1,2-dihidropirazolo-3-ona, RWJ-67657 (RW Johnson Pharmaceutical Research Institute); RDP-58 (Sangstat Medical); Scios-469 (talmapimod) (Scios, J&J); inhibidor MKK3/MKK6 (Signal Research Division); análogo de SB-210313, SB-220025 (Aventis), SB-238039, HEP-689, SB-203580 (Leo), SB-239063 (R.W. Johnson), SB-239065, SB-242235 (SmithKline Beecham Pharmaceuticals); VX-702 y VX-745 (Vertex Pharmaceuticals); AMG-548 (Amgen); Inhibidor de la quinasa p38 Astex (Bayer); BIRB-796 (Doramapimod) (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals); RO 4402257 (Pamapimod) (Roche, Palo Alto); Inhibidor de la MAP quinasa p38 Celltech (CeltechGroup plc.); FR-167653 (Fujisawa Pharmaceutical); SB-681323 (Dilmapimod) (GlaxoSmithKline) y SB-281832 (GlaxoSmithKline plc, Scios); inhibidor de la MAP quinasa de LEO Pharmaceuticals (LEO Pharma A/S); inhibidor de la MAP quinasa p38 de Merck & Co. (Merck research Laboratories); SC-040 y SC-XX906 (Monsanto); antagonistas de la adenosina A3 de Novartis (Novartis AG); inhibidor de MAP quinasa p38 (Novartis Pharma AG); CP-64131 (Pfizer); CNI-1493 (Picower Institute for Medical Research); RPR-200765A (Phone-Poulenc Rorer); e inhibidor de la MAP quinasa p38 y Ro-320-1195 de Roche (Roche Bioscience), AIK-3, AKP-001 (ASKA Pharma), antibiótico LL Z1640-2, ARRY-614, ARRY-797, AS-1940477, AVE-9940, AZD-7624, BCT-197, BIRB-1017BS, BMS-582949, CAY10571, CBS-3595, CCT-196969, CCT-241161, CDP-146, CGH 2466, CHR-3620, edisilato de clometiazol, CM PD-1, Doramapimod, EO 1428, FY-101C, FX-005, GSK-610677 (GlaxoSmithKline), HE-3286, HSB-13, JX 401, KC-706 (Kemia), KC-706 (ITX-5061) (iTherX Inc.), LEO-15520, LEO-1606, Losmapimod (GlaxoSmithKline), LP-590, LY-30007113, LY2228820, M L 3403, OX-27-NO, NP-202, pexmetinib, PF-03715455 (Pfizer), PH-797804 (Pfizer), PS-540446, ralimetinib, regorafenib, RO-3201195, RWJ 67657, RWJ-67657, SB 202190 (Leo), SB 203580 (Pfizer), SB 203580 clorhidrato (Pfizer), SB202190, SB202190 clorhidrato (Roche), SB-681323 (Tanabe Seiyaku), SB-856553, SC-80036, SCD-282, SCIO-323, SCIO-469, SD-06, semapimod, SKF 86002, SX 011, SYD-003, TA-5493, TAK 715 (Takeda Pharma), inhibidor de quinasa Tie2 (Tanabe Pharma), TOP-1210, TOP-1630, UR-13870 (Bristol-Myers Squibb), UR-13870 (Palau Pharma) y VGX-1027.

En algunas realizaciones, el inhibidor de la MAP quinasa p38 se puede seleccionar entre 8-(2,6-difluorofenil)-2-(1,3-dihidroxiopropan-2-ilamino)-4-(4-fluoro-2-metilfenil)piridol[2,3-d]pirimidin-7-ona (Dilmapimod), GSK-610677 y 6-[5-(ciclopropilcarbamoil)-3-fluoro-2-metilfenil]-N-(2,2-dimetilpropil)piridina-3-carboxamida (Losmapimod).

En una realización, el inhibidor de la MAP quinasa p38 puede ser 5-[(2-cloro-6-fluorofenil)acetilamino]-3-(4-fluorofenil)-4-(4-pirimidinil)isoxazol (AKP-001).

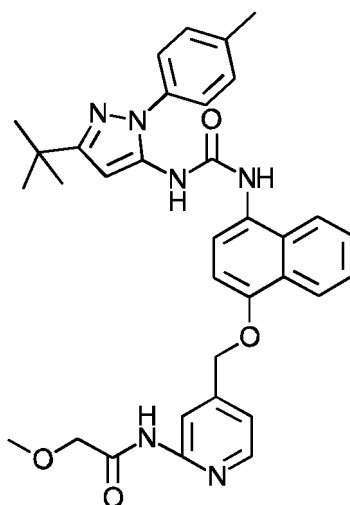
5 En otra realización, el inhibidor de la MAP quinasa p38 puede ser KC-706.

En otra realización, el inhibidor de la MAP quinasa p38 puede ser (1-[5-*tert*-butil-2-(3-cloro-4-hidroxfenil)pirazol-3-il]-3-[[2-[[3-[2-(2-hidroxi-etilsulfanil)fenil]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-6-il]sulfanil]fenil]metil]urea) (PF-03715455).

10 En otra realización, el inhibidor de la MAP quinasa p38 (3-[3-bromo-4-[(2,4-difluorofenil)metoxi]-6-metil-2-oxopiridin-1-il]-N,4-dimetilbenzamida) (PH-797804).

En otra realización, el inhibidor de la MAP quinasa p38 puede ser 2-metoxi-1-[4-[(4-[3-[5-(*tert*-butil)-2-(*p*-tolil)-2H-pirazol-3-il]ureido)-1-naftiloxi]metil]-2-piridilamino]-1-etanona (RV-568):

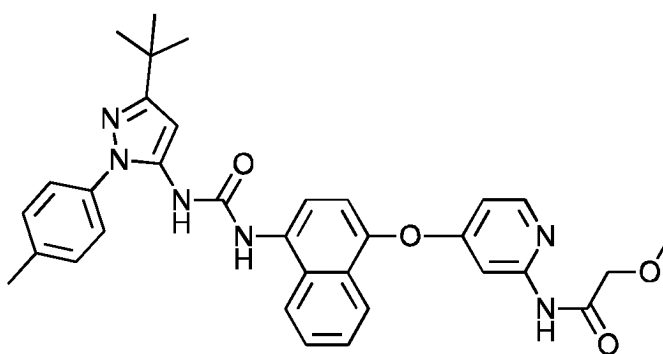
15



RV-568

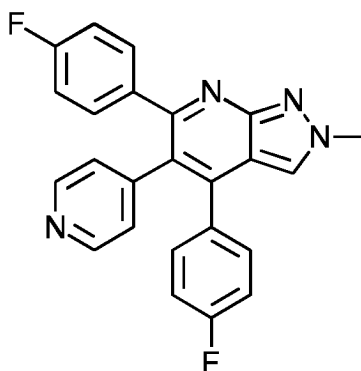
Como alternativa, el inhibidor de la MAP quinasa p38 puede ser 2-metoxi-1-[4-(4-[3-[5-(*tert*-butil)-2-(*p*-tolil)-2H-pirazol-3-il]ureido)-1-naftiloxi)-2-piridilamino]-1-etanona:

20



En otra realización, el inhibidor de la MAP quinasa p38 puede ser 4,6-bis(*p*-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)-1,2,7-triaza-2H-indeno:

25



En otra realización, el inhibidor de la MAP quinasa p38 puede ser RV-7031.

5 La presente invención no se limita a los inhibidores específicos de MAPK p38 enumerados anteriormente. Se puede ensayar un compuesto candidato para determinar la actividad inhibidora de MAPK p38 usando un ensayo de inhibición de enzima adecuado del tipo conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la actividad inhibidora de la enzima de un compuesto se puede determinar mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), tal como se describe en los ejemplos más adelante. Otros ensayos adecuados se describen en Lee, *et al.*, 2000.

10 El uso de un inhibidor de la MAP quinasa p38 de acuerdo con la presente invención tiene como objetivo atenuar la respuesta inflamatoria en un paciente con gripe grave, en lugar de eliminarla, con el objetivo de mitigar los efectos dañinos de la inflamación fuera de control, conservando sus efectos protectores y pro-resolución de enfermedades. Es probable que la eliminación total de la inflamación promueva la mortalidad en casos de gripe grave, mientras que la atenuación de este proceso explosivo debería proporcionar protección contra los efectos dañinos causados por un exceso de respuestas inflamatorias, a la vez que se conservan las actividades de defensa innatas esenciales del hospedador. Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo "reequilibrar el sistema" en lugar de eliminar los componentes en su totalidad.

15 El inhibidor de MAPK p38 se puede administrar de forma sistémica o no sistémica, tal como por vía oral o tópica, incluyendo la vía epidérmica, bucal, intranasal o por inhalación (aerosol), o tanto por vía intranasal como por inhalación o por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea) o en combinación por vía tópica y parenteral.

20 Tal como se usa en el presente documento, "por vía tópica" incluye la administración no sistémica. Esto incluye la aplicación de un compuesto por vía externa a la epidermis o a la cavidad bucal y la instilación de dicho compuesto en el oído, el ojo y la nariz.

25 Tal como se usa en el presente documento, "administración sistémica" se refiere a la administración oral, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular, intranasal, subcutánea, intrarrectal o intravaginal.

30 Los expertos en la técnica reconocerán que la cantidad y el espaciamiento óptimos de las dosis individuales de un inhibidor de la MAPK p38 estarán determinados por la naturaleza y extensión de la afección que se está tratando, la forma, la vía y el lugar de administración, y el paciente particular que se está tratando, y que tales óptimos se pueden determinar mediante técnicas convencionales. También se apreciará por un experto en la técnica que el curso óptimo de tratamiento, es decir, el número de dosis de un inhibidor de la MAPK p38 administradas por día durante un número definido de días, puede ser determinado por los expertos en la técnica usando pruebas de determinación de curso de tratamiento convencionales. Sin embargo, en vista de su papel clave de señalización, el direccionamiento a la MAP quinasa p38 puede provocar efectos secundarios no deseados. Para minimizar dichos efectos secundarios, el inhibidor de la MAP quinasa p38 se puede administrar a un paciente de acuerdo con la presente invención durante un período máximo de 1 a 5 días, preferentemente 1-3 días. En algunas realizaciones, el inhibidor de la MAP quinasa p38 se puede administrar durante solo uno o dos días. También se puede preferir el tratamiento una vez al día para minimizar cualquier efecto secundario perjudicial.

35 En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la gripe grave en un paciente humano, comprendiendo la composición un inhibidor de la MAPK p38; en donde la gripe grave se caracteriza por síntomas que persisten o reaparecen durante más de 2 días sin signos de resolución, y el inhibidor de la MAP quinasa p38 inhibe la liberación de mediadores proinflamatorios de las células endoteliales e inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias de células inmunitarias.

40 Tal como se ha descrito anteriormente, la gripe grave se puede caracterizar por síntomas que persisten o reaparecen durante más de 3, 4, 5 o más días sin signos de resolución. Los síntomas que persisten o reaparecen pueden incluir fiebre (es decir, una temperatura superior a 100 °F/38 °C), letargo, dolor, congestión, tos, congestión

nasal, secreción nasal o congestión o inflamación de las vías respiratorias superiores.

5 . El inhibidor de la MAPK p38 se puede combinar opcionalmente con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Los diluyentes y vehículos pueden incluir los adecuados para la administración parenteral, oral, tópica, mucosal y rectal.

10 La composición farmacéutica de la invención se puede preparar, por ejemplo, para administración por vía parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular o periarticular, en particular, en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, en particular, en forma de comprimidos o cápsulas; para administración tópica, por ejemplo, pulmonar o intranasal, en particular, en forma de polvos, gotas o aerosoles nasales y administración transdérmica; para administración mucosal, por ejemplo, para administración bucal, sublingual o vaginal mucosal, y para administración rectal, por ejemplo, en forma de supositorio.

15 La composición se puede administrar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985). Una formulación para administración parenteral puede contener como excipientes agua estéril o solución salina, alquilenglicoles tales como propilenglicol, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Una formulación para administración nasal puede ser sólida y puede contener excipientes, por ejemplo, lactosa o dextrano, o pueden ser soluciones acuosas u oleosas para su uso en forma de gotas nasales o aerosol medido. Para la administración bucal, los excipientes típicos incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado y similares.

25 Una composición adecuada para administración oral puede comprender uno o más vehículos y/o excipientes fisiológicamente compatibles y puede estar en forma sólida o líquida. Los comprimidos y cápsulas se pueden preparar con aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, tales como lactosa, sacarosa, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes, tales como estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; y tensioactivos, tales como laurilsulfato sódico. Una composición líquida puede contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, por ejemplo jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de azúcar, gelatina, carboximetilcelulosa o grasas comestibles; agentes emulsionantes tales como lecitina o goma arábica; aceites vegetales tales como aceite de almendras, aceite de coco, aceite de hígado de bacalao o aceite de cacahuete; conservantes tales como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT). Una composición líquida se puede encapsular en, por ejemplo, gelatina para proporcionar una forma de dosificación unitaria.

35 Una forma de dosificación oral sólida puede incluir comprimidos, cápsulas de cubierta dura de dos piezas y cápsulas de gelatina elástica blanda (GEB).

40 Una formulación de cubierta seca típicamente comprende de aproximadamente de un 40 % a un 60 % de concentración de gelatina, de aproximadamente un 20 % a un 30 % de concentración de plastificante (tal como glicerina, sorbitol o propilenglicol) y entre aproximadamente un 30 % y un 40 % de agua. Otros materiales tales como conservantes, colorantes, opacificantes y aromatizantes también pueden estar presentes. El material de relleno líquido puede comprender un fármaco sólido que se ha disuelto, solubilizado o dispersado (con agentes de suspensión tales como cera de abejas, aceite de ricino hidrogenado o polietilenglicol 4000) o un fármaco líquido en vehículos o combinaciones de vehículos tales como aceite mineral, aceites vegetales, triglicéridos, glicoles, polioles y agentes tensioactivos.

50 En algunas realizaciones, la composición de la invención se puede administrar tópicamente al pulmón. En algunas realizaciones, por tanto, la composición de la invención puede comprender un inhibidor de MAPK p38 opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos tópicamente aceptables. La administración tópica al pulmón se puede lograr mediante el uso de una formulación en aerosol. Las formulaciones en aerosol comprenden típicamente el ingrediente activo suspendido o disuelto en un propulsor de aerosol adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC) o un hidrofluorocarbono (HFC). Los propulsores de CFC adecuados incluyen tricloromonofluorometano, diclorotetrafluorometano y diclorodifluorometano. Los propulsores HFC adecuados incluyen tetrafluoroetano (HFC-134a) y heptafluoropropano (HFC-227). El propulsor comprende típicamente del 40 % al 99,5 %, por ejemplo, del 40 % al 90 % en peso de la composición de inhalación total. La formulación puede comprender excipientes que incluyen codisolventes (por ejemplo, etanol) y tensioactivos (por ejemplo, lecitina, trioleato de sorbitán y similares). Las formulaciones en aerosol se envasan en botes y se administra una dosis adecuada por medio de una válvula dosificadora (por ejemplo, la suministrada por Bepak, Valois o 3M).

60 La administración tópica al pulmón también se puede lograr mediante el uso de una formulación no presurizada, tal como una solución o suspensión acuosa. Esto se puede administrar mediante un nebulizador. La administración tópica al pulmón también se puede lograr mediante el uso de un inhalador de dosis medida presurizada (IDMp) o una formulación de polvo seco. Una formulación de polvo seco contendrá el inhibidor de MAPK p38 en forma finamente dividida, típicamente con un diámetro medio de masa (MMAD) de 1-10 micrómetros. La formulación normalmente contendrá un diluyente tópicamente aceptable, tal como lactosa, normalmente de gran tamaño de

partícula, por ejemplo, un diámetro medio de masa (MMAD) de 100 μm o más. Ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS y CLICKHALER.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La FIG. 1 ilustra la identificación de las vías de señalización.
- 10 La FIG. 2 ilustra el mapeo de la actividad de genes en vías estimuladas por IL-1, TNF α e IL-6. Estas citocinas son producidas por células infectadas por el virus de la gripe y se encuentran aumentadas en la sangre de las personas infectadas con la gripe, en particular, aquellos hospitalizados con gripe grave. Las líneas sombreadas indican niveles de expresión génica con líneas inclinadas de arriba a la derecha a abajo a la izquierda que indican regulación positiva (por ejemplo, TNF- α), y líneas inclinadas de arriba a la izquierda a abajo a la derecha (por ejemplo, LBP) que indican regulación negativa; los genes que están regulados positivamente y regulados negativamente se indican mediante sombreado cruzado. El espaciado de línea representa la intensidad de la regulación positiva o negativa, con líneas más densamente empaquetadas que indican una mayor actividad. Los mapas se generaron utilizando IPA. Una "ruta" a través de una vía se define como una única conexión contigua de proteínas que se extiende desde la membrana plasmática hasta el núcleo.
- 20 La FIG. 3 muestra un ejemplo de puntuación de una ruta a través de la vía de IL-6 de la FIG. 2.
- La FIG. 4 muestra tres tipos de células clave implicadas en la patología de la gripe grave.
- 25 La FIG. 5 es un esquema de la producción de "sopa" de la gripe y el análisis de quimioluminiscencia electrogenerada en células epiteliales humanas. Las "sopas" de células infectadas contienen citocinas clave que se encuentran en muestras clínicas.
- 30 La FIG. 6 muestra el análisis por transferencia de Western de P38 y HSP27 fosforiladas en respuesta a la aplicación de la sopa vírica y los efectos de la inhibición de P38 en las células epiteliales. El análisis de quimioluminiscencia electrogenerada de la producción de citocinas inflamatorias en respuesta a la aplicación de la sopa vírica y efectos de la inhibición de P38 en células epiteliales.
- 35 La FIG. 7 muestra el análisis por transferencia de Western de HSP27 fosforilada en respuesta a la aplicación de la sopa vírica y los efectos de la inhibición de P38 en las células endoteliales. El análisis de quimioluminiscencia electrogenerada de la producción de citocinas inflamatorias en respuesta a la aplicación de la sopa vírica y efectos de la inhibición de P38 en células endoteliales.
- 40 La FIG. 8 muestra el análisis por transferencia de Western de HSP27 fosforilada en respuesta a la aplicación de la sopa vírica y los efectos de la inhibición de P38 en las células inmunitarias. El análisis de quimioluminiscencia electrogenerada de la producción de citocinas inflamatorias en respuesta a la aplicación de la sopa vírica y efectos de la inhibición de P38 en células inmunitarias. Viabilidad celular de las células inmunes en respuesta a concentraciones en aumento del inhibidor de P38.
- 45 La FIG. 9 muestra un análisis de quimioluminiscencia electrogenerada de la producción de citocinas inflamatorias en respuesta a LPS, CD-3 y la aplicación de la sopa vírica. Efectos de la inhibición de P38 sobre citocinas inflamatorias inducidas por la sopa vírica en células inmunitarias.
- 50 La FIG. 10 muestra los efectos de los inhibidores de p38 y MEK sobre la producción de IP10 por HUVEC estimuladas con sopa vírica de HBEC al 70 %. Los niveles de citocinas secretadas se ensayaron mediante quimioluminiscencia electrogenerada. La significación estadística se calculó usando ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnett *a posteriori*.
- 55 La FIG. 11 muestra los efectos de los compuestos sobre la producción de IL-1b a partir de células inmunitarias. Cada punto del diagrama de puntos representa un experimento individual. La significación estadística se calculó usando ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnett *a posteriori*.
- 60 La FIG. 12 muestra efectos de los compuestos sobre la producción de TNF α a partir de células inmunitarias. Cada punto del diagrama de puntos representa un experimento individual. La significación estadística se calculó usando ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnett *a posteriori*.
- 65 La FIG. 13 muestra los efectos de los compuestos sobre la producción de IP10 a partir de células endoteliales. Cada punto del diagrama de puntos representa un experimento individual. La significación estadística se calculó usando ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnett *a posteriori*.
- La FIG. 14 muestra los efectos de los compuestos sobre la producción de IL8 a partir de células endoteliales. Cada punto del diagrama de puntos representa un experimento individual. La significación estadística se calculó usando ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Dunnett *a posteriori*.

La FIG. 15 muestra los niveles de citocinas en 28 voluntarios sanos infectados con el virus de la gripe (muestras recolectadas del Día -1 al Día 28, puntos huecos) y 30 individuos hospitalizados con gripe grave (puntos punteados). Las muestras de sangre de los pacientes graves se recogieron entre 24 y 72 horas después del ingreso en el hospital. La significación estadística de las diferencias en los niveles de citocinas entre los voluntarios sanos infectados (D2 y D3) y los pacientes hospitalizados (gripe A o B) se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación de la MAPK p38 por análisis transcriptómico

El análisis bioinformático de datos transcriptómicos de muestras de sangre recolectadas de voluntarios humanos y pacientes infectados con gripe se utilizó para mapear las vías de señalización activadas en la respuesta del hospedador humano a la infección por gripe tanto en gripe no complicada (leve y moderada) como en gripe grave (véase la Guía de uso de PHE de agentes antivíricos para el tratamiento y la profilaxis de la gripe estacional (2015-16), versión 6.0, septiembre de 2015). Se llevaron a cabo estudios de exposición vírica en humanos y los datos transcriptómicos de esos estudios se utilizaron para mapear el primero, mientras que los datos transcriptómicos de un estudio de muestreo de campo (Hoang, L.T. *et al.*, 2014) se utilizaron para mapear este último. La comparación de las vías de señalización identificadas mediante la comparación de ambos conjuntos de datos permitió identificar las vías de señalización que son muy activas en la gripe grave frente a la gripe leve y moderada. Un análisis adicional de los componentes de las vías individuales identificó la MAPK p38 como un "nodo" clave en varias de estas vías activas.

Los voluntarios humanos sanos fueron expuestos por vía intranasal con gripe A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (Zaas, AK *et al.*, Gene expression signatures diagnose influenza and other symptomatic respiratory viral infection in humans, *Cell Host Microbe*, 2009; 17: 207-217 y Davenport, E.E. *et al.*, Transcriptomic profiling facilitates classification of response to influenza challenge, *J. Mol. Med.*, 2015; 93: 105-114) o con gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) (estudio interno, no publicado). Se recogieron muestras de PAXgene™ de sangre completa de los voluntarios en varios puntos de tiempo para el posterior análisis del transcriptoma. Los métodos para la exposición al virus de la gripe A/Wisconsin/67/2005 (H3N2), las definiciones del caso, la recogida de las muestras, la purificación del ARN y el análisis de micromatrices se detallan en Zaas *et al.*, 2009 y Davenport *et al.*, 2015. Los métodos para la exposición al virus de la gripe A/Perth/16/2009 (H3N2), las definiciones de los casos y la recolección de las muestras fueron las descritas para la cepa de Wisconsin, excepto que Almac realizó la purificación de ARN y el análisis de micromatrices utilizando matrices Affymetrix HGU133 Plus 2.0 (<https://web.archive.org/web/20160317153848/http://www.almacgroup.com/>). Los métodos para reclutar pacientes con gripe grave, la recogida de muestras de sangre, la purificación de ARN y el análisis de micromatrices se detallan en Hoang *et al.*, 2014.

Microarray data files for the Zaas *et al.*, 2009, Davenport *et al.*, 2015 y Hoang *et al.*, 2014, los estudios se descargaron de la base de datos de Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://web.archive.org/web/20160622040853/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) utilizando los números de registro GSE52428, GSE61754 y GSE61821, respectivamente. Los archivos de datos de micromatrices (.CEL) para el estudio no publicado se descargaron de Almac y se almacenaron localmente para el análisis bioinformático. Los cuatro conjuntos de datos transcriptómicos se procesaron y analizaron utilizando el conjunto integrado de recursos de software R (versión 3.0.2.) para la manipulación de datos, el cálculo y la visualización gráfica (<https://web.archive.org/web/20160623011408/http://www.R-project.org>). La evaluación de la calidad de los datos de micromatrices sin procesar se realizó utilizando métodos estadísticos estándar en la técnica (por ejemplo, Heber, S. y Sick, B., Quality assessment of affymetrix genechip data, *Omics*, 2006; 10: 358-368). Los conjuntos de datos de Affymetrix se normalizaron mediante el método Robust Multi-array Average (RMA) [<https://www.bioconductor.org/packages/3.3/bioc/manuals/affy/man/affy.pdf>] y los conjuntos de datos de Illumina se normalizaron utilizando el paquete Lumi [<https://www.bioconductor.org/packages/3.3/bioc/manuals/lumi/man/lumi.pdf>]. Ambos paquetes se ejecutaron en el entorno R. Para facilitar la anotación de conjuntos de sondas y nombres de genes, los archivos de definición de la microplaca Affymetrix (versión 17.1.0) se descargaron del sitio web BrainArray (<https://web.archive.org/web/20160623112758/http://brainarray.mbni.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomC/DF/17.1.0/ensg.asp>) y los archivos de definición de la microplaca Illumina (illuminaHumanv4.db) se descargaron del sitio web de Bioconductor (<https://web.archive.org/web/20151209032754/http://bioconductor.org/packages/release/data/annotation/html/illuminaHumanv4.db.html>).

Los últimos archivos se utilizaron con datos de micromatrices de Davenport *et al.*, 2015 y Hoang *et al.*, 2014.

Los conjuntos de datos normalizados de Zaas *et al.*, 2009, Davenport *et al.*, 2015 y Perth se fusionaron individualmente con el conjunto de datos de Hoang *et al.*, 2014 utilizando el módulo COMBAT en el paquete InSilicoMerging en Bioconductor (<https://web.archive.org/web/20150905151657/http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/inSilicoMerging>

ng.html). El análisis de expresión genética diferencial en conjuntos de datos combinados se llevó a cabo utilizando el paquete limma en R (<https://www.bioconductor.org/packages/3.3/bioc/vignettes/limma/inst/doc/usersguide.pdf>). Para las comparaciones por pares, solo se utilizaron los conjuntos de datos de voluntarios infectados en Zaas *et al.*, 2009, Davenport *et al.*, 2015 y Perth, equivalentes a 11, 14 y 5 sujetos, respectivamente. Del conjunto de datos de Hoang *et al.*, 2014 solo se utilizaron los datos de los tres pacientes con gripe grave infectados por H3N2 incluidos en el conjunto de datos. Para cada conjunto de datos combinados, se realizaron dos comparaciones por pares para identificar genes que estaban regulados positivamente en relación con los niveles iniciales después de la infección con el virus y luego se regularon positivamente en las muestras de pacientes graves:

10 Perth: día -1 frente al día 3 y; día 3 frente a Hoang *et al.*, 2014, grave.

Zaas *et al.*, 2009: día -1 frente a 60 horas y; 60 horas frente Hoang *et al.*, 2014, grave.

15 Davenport *et al.*, 2015: día 0 frente a 48 horas y; 48 horas frente Hoang *et al.*, 2014, grave.

Para maximizar el número de genes regulados positivamente que podrían mapearse en vías, se identificaron todos los genes que mostraban múltiplos de variación > 0. Cada una de las 6 listas de genes resultantes se analizó mediante el uso del análisis de las vías Ingenuity® de QIAGEN (IPA®, QIAGEN Redwood City, <https://web.archive.org/web/20131021061639/http://www.ingenuity.com/>). Esto dio como resultado la identificación de 650 vías de señalización que se redujeron a 353 después de la eliminación de 297 vías metabólicas. La FIG. 1 resume este proceso.

Para cuestionar la relevancia de cada una de estas vías de señalización para la patogenia de la gripe grave, se diseñó un enfoque de puntuación manual para identificar "rutas" muy activas dentro de estas rutas en los conjuntos de datos de gripe complicada frente a "no complicada". En este contexto, las "rutas" se definen como conexiones contiguas de proteínas en una vía canónica que se extiende desde la membrana plasmática hasta el núcleo. Como resultado, una vía canónica puede tener varias rutas diferentes a través de ella. Usando este enfoque de puntuación, las rutas dentro de las vías canónicas de IPA se mapearon direccionalmente desde la membrana plasmática hasta el núcleo y se utilizó la función de "superposición" en IPA para mostrar la actividad genética. Para ilustrar este proceso, en la FIG. 2 se muestra un ejemplo de tres vías identificadas usando este método.

Las rutas individuales en las 353 vías identificadas se puntuaron manualmente para la actividad génica tal como se ejemplifica en la FIG. 3 para una ruta a través de la vía canónica de IL-1 en la que:

35 **Tabla 1**

Vía	Ruta	Nodos regulados positivamente	Nodos no regulados positivamente
Señalización de IL-6	IL6R + GP130-SHC-GRB2-SOS-Ras-cRAF-MEK-ERK-ELK+SRF	81 %	SHC-Ras

En total, se identificaron 491 rutas que mostraban ≥ 75 % de nodos regulados positivamente (ejemplificados en la Tabla 2 a continuación). De estas, se identificaron 95 rutas que contenían > 3 nodos en los que el 100 % de todos los nodos de la ruta estaban regulados positivamente en el conjunto de datos de Hoang *et al.*, 2014 de gripe grave frente a los datos iniciales (D-1 o D0) en los conjuntos de datos de Zaas *et al.*, 2009, Davenport *et al.*, 2015 y Perth (Tabla 3). Se demostró que veinticuatro de estas 95 rutas estaban reguladas positivamente ≥ 75 % en comparación con las rutas que provienen de los conjuntos de datos de gripe H3N2 y H1N1 leve y moderada de Hoang *et al.*, 2014 (H3N2 y H1N1 - leve y moderada) y Zaas *et al.*, 2009 (H1N1 - D-1 y 60 h; Tabla 4).

45 La inspección de las 95 rutas destacó una serie de nodos potencialmente diana de los cuales se eligió la MAPK p38 debido a su función bien caracterizada en la inflamación y la disponibilidad de inhibidores de moléculas pequeñas clínicamente probados de alta calidad para su uso en estudios *in vitro* y *ex vivo*.

Tabla 2. Un ejemplo de análisis de puntuación de ruta.

Vía	Ruta	Nodos	Nodos ↑ (%)	↓Nodos
NFKB	receptores del factor de crecimiento-RAS-RAF-MEKK1-IKKa-NFKB2-RELB-linfogénesis	10	92	IKKB
NFKB	IL-1R/TLR-MYD8 8-TYRAP-IRAP-IRAK-TRAF6-TAK1-IKKa-IKBP65-P65NFKB-P65NFKB-inflamación	8	93	IKKB
Papel de JAK1 y JAK3 en la señalización de citocinas	IL21Ralfa/IL2Rgamma-JAK3-STAT1/3/5*	4	100	

50

(continuación)

Vía	Ruta	Nodos	Nodos ↑ (%)	↓Nodos
PI3K-AKT señalización RTK	Integrina-PINCH-ILK-PI3K-PP2A-AKT-CRAF-MEK1/2-ERK1/2-P70S6K-crecimiento de células	9	89	
PI3K-AKT señalización RTK	Integrina-PINCH-ILK-PI3K-PP2A-AKT-CRAF-MEK1/2-ERK1/2-P70S6K-crecimiento de células	9	89	
Integrina de señalización PI3K-AKT	Integrina-PINCH-ILK-PI3K-PP2A-AKT-CRAF-MEK1/2-ERK1/2-P70S6K-crecimiento de células	9	78	
NFKB	TNF-TANK-TRAF-FADD-RIP-MAP3K3-IKKa-IKBP65-P65NFKB-P65NFKB-inflamación	7	87,5	TNF-R/IKKB
Señalización CNTF	(CNTFR-LIFR-GP130)-JAK1/2-SHP2-GRB2-SOS-RAS-CRAF-MEK1/2-ERK1/2-P()RSK-expresión génica	10	90	SHP2
Señalización CNTF	(CNTFR-LIFR-GP130)-TYK2-STAT1/3-expresión génica	3	100	
papel de JAK en la señalización de citocinas de tipo IL-6	(GP130-OSMR)-señalización intermedia-ERK1/2-p38MAPK-JNK -señalización	4	100	
papel de JAK en la señalización de citocinas de tipo IL-6	(GP130-OSMR)-JAK2-STAT1/3/5-expresión génica	3	100	
papel de JAK en la señalización de citocinas de tipo IL-6	(GP130-OSMR)-STAT1/3-expresión génica	2	100	
Señalización de HER-2 en cáncer de mama	(HER1/HER2)-GRB2-SOS-RAS-(CICLIND1-CDK6-CICLINA-p27KIP1)-progresión y proliferación del ciclo celular	5	80	HER1-HER2
Señalización de HER-2 en cáncer de mama	(HER1/HER2)-PI3K-AKT-CICLIND1-progresión del ciclo celular	4	75	HER1-HER2
papel de JAK1, JAK2 y TYK2 en señalización de interferón	(I FNAR1-I FNAR2)-TYK2-STAT2-STAT1-expresión génica	4	100	
Señalización de IL-9	(IL-9R-IL2R) -JAK3-IRS1/2-PI3K-PI3k señalización	5	100	

Tabla 3. Noventa y cinco rutas que contienen el 100 % de nodos regulados positivamente en el conjunto de datos de gripe grave de Hoang et al., 2014 frente a los conjuntos de datos de referencia de Zaas et al., 2009, Davenport et al., 2015 y Perth.

5

Vía	Ruta	Numero de nodos
Señalización de leucemia mieloide aguda	FLT3-GRB2-SOS-RAS-RAF-MEK-ERK1/2-proliferación celular	7
Señalización de Gaq	GqR-Ga/b/y-PYK2-PI3K-AKT-IKK-NFKB*	7
Señalización de MAPK p38	TNFR/fas-TRADD/FAD-TRAF2-Ask 1 -MKK4-P38MAKa-CHOP-transcripción	7
Señalización de MAPK p38	TNFR/fas-TRADD/FAD-TRAF2-Ask 1 -MKK4-P38MAKa-ELK1-transcripción	7
Señalización de MAPK p38	TNFR/fas-TRADD/FAD-TRAF2-Ask1-MKK4-P38MAPKa-MEF2	7
Señalización SAPK/JNK	TRADD/RIP/FADD-TRAF2-GCKs-MEKK1-MKK4/7-JNK-ELK-1*	7
Unión entre células de Sertoli	CLDN-ZO2-factina-actinina alfa-tubulina-KEAPI-	7
señalización	Dinámica de la unión myo7a	
Señalización de HIF1a	RTK-PI3 K-AKT-HIF 1a-ARNT-ET1-tono vascular*	6
Señalización de HIF1a	RTK-PI3K-AKT-HIF1a-ARNT-MMPs-ECM regulación*	6
Señalización de IL6	TNFR-TRAF2-TAK 1 -MKK4/7-JNK-ELK 1*	6
Señalización de proteína quinasa A	PKAr/PKAc-RAP1-BRAF-MEK1/2-ERK1/2-ELK1*	6

ES 2 859 476 T3

(continuación)

Vía	Ruta	Numero de nodos
Señalización SAPK/JNK	TRADD/RIP/FADD-TRAF2-ASK1-MKK4/7-JNK-ELK1*	6
Señalización de ERK5	SRC-MEKK2/3 -MEK5 -ERK5 -SAP 1*	5
Señalización del receptor de glucocorticoides	RECEPTOR DE CITOQUINA-TRAF2-TAK1-MKK4/7-P38MAPK-ESTABILIZACIÓN DE ARNm, TRADUCCIÓN*	5
Señalización de la hormona del crecimiento	GHR-JAK2-ERK1/2-CEBPA*	5
Señalización de la hormona del crecimiento	GHR-JAK2-ERK1/2-P90RSK-SRF/ELK1*	5
Señalización de HIF1a	RTK-PI3K-AKT-HIF1a-ARNT-GLUT*	5
Señalización de HIF1a	RTK-PI3K-AKT-HIF1a-ARNT-VEGF*	5
Señalización de IL-22	IL22R1/2-TYK2-STAT1/3/5-SOCS3*	5
IL-8	CXCR1/2 - PI3K-Akt-AP1-IntegrinaAlfavBeta3 (quimiotaxis)	5
IL-8	CXCR1/2 - Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2-(Desgranulación de neutrófilos)	5
Señalización de leptina en obesidad	LEPR-JAK2-STAT3-(SOCS3-POMC)-aMSH-anorexia	5
Señalización de paxilina	Integrina/b-FAK-GRB2-SOS-Ras-ERK/MAPK*	5
Papel de los receptores tipo RIG en la inmunidad innata antivírica	ARNdc-RIG1-IPS1-TRAF3-TBK1-IRF7-(IFNa-MDA5/LGP2/RIG1)*	5
Papel de los receptores tipo RIG en la inmunidad innata antivírica	MDA5-IPS1-TRAF3-TBK1-IRF7-(IFNa-MDA5/LGP2/RIG1)*	5
Papel de los receptores tipo RIG en la inmunidad innata antivírica	TRIM25-RIG1-I PS 1-TRAF3-IRF7-(IFNa-MDA5/LGP2/RIG1)*	5
Señalización de CD40	CD40-JAK3-STAT3-ICAM1 *	4
Señalización de ceramida	EDG-SPHK-NFKB-AP1-activación de genes inflamatorios	4
Señalización de ceramida	SMPD-(ceramida)-PI3K-AKT-apoptosis*	4
Señalización de eicosanoides	PLA2-ALOX5-LTA4h-LTB4R-quimiotaxis/proliferación/asma alérgica/angiogénesis/	4
Señalización G alfa I	RECEPTOR GI ACOPLADO-Galfai/Gbeta/Ggamma-SRC-STAT3*	4
Señalización de unión entre células germinales y células de Sertoli	Despolimerización TGFbetaR-RAS-MEK1/2-ERK1/2-actina*	4
Señalización de GM-CSF	GMCSFRA-HCK-PI3K-AKT-supervivencia celular/proliferación celular*	4
Señalización de GM-CSF	GMCSFRA-JAK2-STAT3-(BCLXL - CYCLIND1)*	4
Señalización del receptor acoplado a proteína G	Receptor Gi acoplado-GALFAi/0-SRC-STAT3 *	4
Señalización de IGF-1	IGF1R-JAK 1/2-STAT3-SOCS3*	4
IL-8	CXCR1/2 - JNK - NFKB - ICAM-1	4
IL-8	CXCR1/2 - PI3K-MEK1/2-ERK1/2-(Desgranulación de neutrófilos)	4
IL-8	CXCR1/2 - Rho - NFKB - ICAM-1	4
JAK/STAT	receptor de citoquinas-JAK-STAT-(CFOS-IL6-SOCS-BCLXL)*	4
Vía de señalización MSP-RON	RON-PI3K-PKC zeta-F-ACTINA-actividad fagocítica en macrófagos*	4

ES 2 859 476 T3

(continuación)

Vía	Ruta	Numero de nodos
Señalización de PI3K en linfocitos B	IL4R-IRS-P85/PI3K-P110/PI3K-NFKB	4
Activación de PPAR α /RXR α	ADIPOR-AMPK-P3 8MAPK-PPAR α	4
Producción de óxido nítrico y ROS en macrófagos	TLR2/4-PI3K-AKT-NFKB-Inos	4
Producción de óxido nítrico y ROS en macrófagos	TLR2/4-MKK4/-JN K-AP1	4
Activación de RAR	IL-3R α /b-JAK2-STATS-RAR/RXR*	4
Papel de la señalización de MAPK en la patogenia de la gripe	ASK-1-MKK4/7-JN K-CASP3-APOPTOSIS	4
Papel de los receptores tipo RIG en la inmunidad innata antivírica	ARNdc-RIG1-IPS1-TRAF3-IRF7-(IFNa-MDA5/LGP2/RIG1)*	4
Papel de los receptores tipo RIG en la inmunidad innata antivírica	MDA5-IPS 1-TRAF3-IRF7-(IFNa-MDA5/LGP2/RIG1)*	4
Señalización por GTPasas de la familia Rho	Integrina-ARHGEF-RHO-FAK-reorganización del citoesqueleto*	4
Señalización por GTPasas de la familia Rho	Integrina-ARHGEF-RHO-PKNI-tráfico celular*	4
Señalización de esfingosina-1-fosfato	SIPR(2/3/4)-GAI-PI3K-AKT-SUPERVIVENCIA CELULAR*	4
Señalización de Tec quinasa	Integrina-FAK-TEC QUINASA-(FAK, PKC, PAK, VAV, FACTINA, RHOGTPASA, NFKB,JNK,STAT-TFII-1 *)	4
Señalización de Tec quinasa	TCR-SRC-TEC QUINASA-(FAK,PKC,PAK,V A V, FACTINA, RHOGTPASA, NFKB,JNK,STAT-TFII-1 *)	4
Señalización de leucemia mieloide aguda	FLT3-STAT3/5-PIM1-regula la apoptosis	3
Acción antioxidante de la vitamina C	CSF2R α /beta-JAK2-STAT5-expresión génica*	3
Señalización CNTF	(CNTFR-LI FR-GP130)-TYK2-STAT1/3-expresión génica*	3
Maduración de células dendríticas	LTbetaR-IKK-RELB/NFKB-presentación cruzada	3
Señalización del RECEPTOR DE EFRINA	EPHA-JAK2-STAT3-PROLIFERACIÓN CELULAR*	3
Señalización del RECEPTOR DE EFRINA	EPHB-PI3KG-AKT-MIGRACIÓN CELULAR, PROLIFERACIÓN CELULAR	3
Señalización del RECEPTOR DE EFRINA	INTEGRINA-MEK1/2-ERK1/2-ORIENTACIÓN DEL AXÓN, PROLIFERACIÓN CELULAR*	3
Señalización de Fc γ RIIB en linfocitos B	FC γ R-BTK-JNK-apoptosis*	3
Señalización del receptor de glucocorticoides	RECEPTOR DE CITOCINA-JAK2-STAT1*	3
Señalización del receptor de glucocorticoides	RECEPTOR DE CITOCINA-JAK3-STAT3/5*	3
Señalización GNRH	GnRHR - Gai - Nf κ B	3
Señalización y producción de IL-12 en macrófagos	TLR4-p38/MAPK-IL12	3
Señalización de IL-3	IL3R α /beta-JAK1/2-STAT1/3/5/6-expresión génica*	3
Señalización de IL6	GP130 (IL6R)-JAK2-STAT3-expresión génica*	3
IL-8	CXCR1 - PLD - NADPH oxidasa - (Producción de superóxido - Explosión respiratoria)	3

(continuación)

Vía	Ruta	Numero de nodos
IL-8	CXCR1-Proteína G alfa/beta/gamma-PI3Ky - (Quimiotaxis-Explosión respiratoria)*	3
Señalización de MAPK estimulada por LPS	TLR4-IKK-IKB-NFKB-expresión génica*	3
Señalización de mTOR	Nutrientes-RHEB-mTORc2-AKT-PI3K/Señalización de AKT*	3
Señalización de mTOR	Nutrientes-RHEB-mTORc2-AKT-(Rho/PKC)-organización de actina	3
Señalización PDGF	PDGFRa/b-SPHK-CRK-mitogénesis*	3
Señalización de proteína quinasa A	PKA-PHK-PYG-glucólisis*	3
Regulación de la mecánica celular por calpaína proteasa	CNG-CALPAÍNA-RB	3
papel de JAK en la señalización de citocinas de tipo IL-6	(GP130-OSMR)-JAK2-STAT1/3/5-expresión génica*	3
Papel de JAK2 en la señalización de citocinas similares a hormonas	GHR-JAK2-IRS-PI3K/SEÑALIZACIÓN DE AKT*	3
Papel de JAK2 en la señalización de citocinas similares a hormonas	GHR-JAK2-STAT1/3-EXPRESIÓN GÉNICA*	3
Papel de JAK2 en la señalización de citocinas similares a hormonas	GHR-JAK2-STAT5-EXPRESIÓN GÉNICA*	3
Papel de los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en la artritis reumatoide	GP130-JAK2-STAT3-expresión génica*	3
Papel de los receptores de reconocimiento de patrones en el reconocimiento de bacterias y virus	NALP3-casp1-IL1b*	3
Papel de los receptores de reconocimiento de patrones en el reconocimiento de bacterias y virus	NOD1-Casp1-IL1b*	3
Papel de la señalización de PI3K/AKT en la patogenia de la gripe	PI3K-AKT-IKB,NFKB	3
Papel del factor tisular en el cáncer	PAR2-ERK1/2-HBEGF-angiogénesis	3
Papel del factor tisular en el cáncer	PAR2-ERK1/2-VEGFa-angiogénesis	3
Papel del factor tisular en el cáncer	PAR2-p38/MAPK-uPar-invasión tumoral	3
Papel del factor tisular en el cáncer	PAR2-p38/MAPK-IL-1b-angiogénesis	3
Papel del factor tisular en el cáncer	PAR2-p38/MAPK-VEGFa-angiogénesis	3
Vía de STAT3	receptores de citocinas-TYK2/JAK2-STAT3-transcripción-respuesta inmunitaria-proliferación-supervivencia*	3
Vía de STAT3	GFR-JAK2/SRC-STAT3-transcripción-respuesta inmunitaria-proliferación -supervivencia*	3

ES 2 859 476 T3

(continuación)

Vía	Ruta	Numero de nodos
Depresión sináptica a largo plazo	AMPA-Lyn-PKC-Fosforilación*	3
Señalización de Tec quinasa	FCeR1-TEC quinasa-(FAK,PKC,PAK,V A V, FACTINA, RHOGTPASA, NFKB,JNK,STAT-TFII-1 *)	3
Señalización de Tec quinasa	TLR4-TEC quinasa-(FAK,PKC,PAK,V A V,FACTINA, RHOGTPASA, NFKB,JNK,STAT-TFII-1 *)	3

Tabla 4. Comparación de las puntuaciones de ruta entre H3N2 y H1N1.

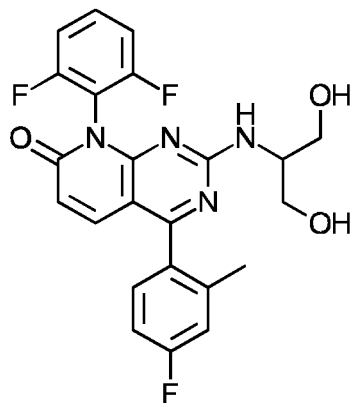
Via	Ruta	H3N2					H1N1				
		H3N2 grave frente a inicial	H3N2 grave al pico	H3N2 grave frente a leve	H3N2 frente a moderada	H3N2 grave a inicial	H1N1 grave al pico	H1N1 grave frente a leve	H1N1 frente a moderada	H1N1 grave a	
Señalización de la hormona del crecimiento	GHR-JAK2-ERK1/2-CEB PA*	100,00	93,33	100,00	100,00	100	75	75	75	75	
Activación de PPARα/RXRα	ADIPOR-AMPK-P38MAPK-PPARalfa-REGULACIÓN de genes de la hormona del crecimiento	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	75	
Señalización GM-CSF	GMCSFRA-HCK-PI3K-AKT-supervivencia celular/proliferación celular*	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	
Señalización esfingosina-1-fosfato	SIPR(2/3/4)-GAI-PI3K-AKT-SUPERVIVENCIA CELULAR*	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	
Señalización de ceramida	SMPD-(ceramida)-PI3K-AKT-apoptosis*	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	
IL-8	CXCR1/2 - PI3K-MEK1/2-ERK1/2-(Desgranulación de neutrófilos)	100,00	93,33	100,00	100,00	100	75	100	100	100	
Señalización de paxilina	Integrina/b-FAK-GRB2-SOS-Ras-ERK/MAPK*	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	
Señalización Tec quinasa	FCeR1-TEC quinasa-(FAK,PKC,PAK,VAV,FACTINA, RHO, GTPASA, NFKB, JNK, STA T-TFI1-1 *)	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	
Señalización Tec quinasa	TCR-SRC-TEC QUINASA-(FAK, PKC, PAK, VAV, FACTINA, RHO, GTPASA, NFKB, JNK, STA T-TFI1-1 *)	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	
Señalización Tec quinasa	TLR4-TEC quinasa-(FAK,PKC,PAK,VAV,FACTINA, RHO, GTPASA, NFKB, JNK, STA T-TFI1-1*)	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	
Señalización por GTPasas de la familia Rho	Integrina-ARHGEF-RHO-PKNI-tráfico celular*	100,00	100,00	100,00	100,00	100	75	75	75	75	
Regulación de la mecánica celular por calpaína proteasa	CNG-CALPAÍNA-RB	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	

(continuación)

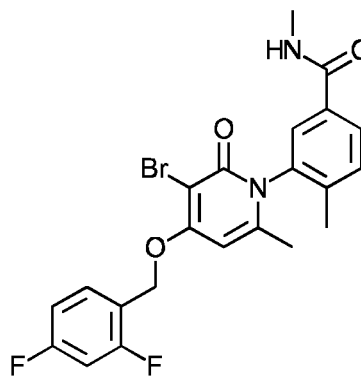
Vía	Ruta	H3N2					H1N1				
		H3N2 grave frente a inicial	H3N2 grave al pico	H3N2 grave frente a leve	H3N2 grave a moderada	H3N2 grave a inicial	H1N1 grave al pico	H1N1 grave frente a leve	H1N1 grave a moderada	H1N1 grave a	
Señalización Tec quinasa	Integrina-FAK-TEC QUINASA-(FAK, PKC,PAK,V AVFACTINA, RHOGTPASA, NFKB, JNK, STA T-TFII-1*)	100,00	100,00	100,00	100,00	100	100	100	100	100	
Señalización de leucemia mieloide aguda	FLT3-GRB2-SOS-RAS-RAF-MEK-ERK1/2-proliferación celular	100,00	100,00	100,00	85,71	100	100	100	100	100	
Señalización por GTPasas de la familia Rho	Integrina-ARHGEF-RHO-FAK-reorganización del citoesqueleto*	100,00	95,23	100,00	100	100	100	100	100	100	
IL-8	CXCR1/2 - Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2-(Desgranulación de neutrófilos)	100,00	91,67	100,00	100	80	80	100	100	100	
JAK/STAT	receptor de citoquinas-JAK-STAT-(CFOS-IL6-SOCS-BCLXL)*	100,00	91,67	100,00	100	75	75	100	100	100	
Vía de señalización de MSP-RON	RON-PI3K-PKC zeta-F-ACTINA-actividad fagocítica en macrófagos*	100,00	91,67	100,00	100	75	75	100	75	75	
Señalización de unión entre células germinales y células de Sertoli	TGFbetaR-RAS-MEK1/2-ERK1/2-despolimerización de actina*	100,00	91,67	100,00	100	100	100	100	100	100	
Papel de la señalización de MAPK en la patogénia de la gripe	ASK-1-MKK4/7-JNK-CASP3-APOPTOSIS	100,00	83,33	100,00	100	75	75	75	75	75	
Papel de la señalización de PI3K/AKT en la patogénia de la gripe	PI3K-AKT-IKB.NFKB	100,00	77,78	100,00	100	100	100	100	75	75	
Señalización de proteína quinasa A	PKAr/PKAc-RAP 1-BRAF-MEK 1/2-ERK1/2-ELK1*	100,00	100,00	83,33	83,33	100	83,33	83,33	83,33	83,33	
IL-8	CXCR1/2 - PI3K-Akt-AP1-IntegrinaAlfavBeta3 (Quimiotaxis)	100,00	80,55	80,00	100	75	80	100	100	100	
Producción de óxido nítrico y ROS en macrófagos	TLR2/4-M KK4/7-JNK-AP1	100,00	91,67	75,00	100	100	100	100	100	100	

Ejemplo 2: Efectos de la inhibición de MAPK p38 sobre la liberación de mediadores inflamatorios en tipos de células clave relevantes para la gripe grave

Se utilizaron dos inhibidores de MAPK p38 en experimentos *in vitro* y *ex vivo*: 1) PH797804, un inhibidor de p38 altamente potente, selectivo y metabólicamente estable competitivo con ATP (Hope HR1, *et al.*, Anti-inflammatory properties of a novel N-phenyl pyridinone inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase: preclinical-to-clinical translation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2009 (Diciembre); 331(3): 882-95); y 2) Dilmapimod (SB-681323 - Betts JC1, *et al.*, Gene expression changes caused by the p38 MAPK inhibitor dilmapimod in COPD patients: analysis of blood and sputum samples from a randomized, placebo-controlled clinical trial, *Pharmacol. Res. Perspect.*, 2015 (Febrero); 3(1): e00094). Las estructuras de estos compuestos son las siguientes:



Dilmapimod



PH797804

Se llevaron a cabo pruebas experimentales de inhibición de MAPK p38 en tres tipos de células que son elementos clave en la patología de la gripe grave: células epiteliales, endoteliales e inmunitarias (FIG. 4).

Células epiteliales

Se infectaron células A549 (células epiteliales basales alveolares humanas de adenocarcinoma) o HBEC (células epiteliales bronquiales humanas) con el virus A/Perth/16/2009 (H3N2) del que se recogió el medio condicionado vírico (o "sopa vírica"). En los experimentos descritos en el presente documento, se realizó la aplicación de sopa vírica sobre las células epiteliales o sobre los otros tipos de células de interés (endoteliales e inmunitarias) para simular la acción de los mediadores inflamatorios que se producen a partir de las células epiteliales infectadas por la gripe.

Para infección, se produjeron reservorios de alto título del virus de la gripe (H3N2) mediante la infección de células MDCK-RVL (disponibles de ATCC como MDCK (NBL-2) (ATCC® CCL-34), que provienen de un riñón de una hembra de cocker spaniel adulta aparentemente normal, de septiembre de 1958, por S.H. Madin y N.B. Darby. La línea es hiperdiploide y hay una distribución bimodal del número de cromosomas. No hay cromosomas marcadores identificables consistentes. En la mayoría de las extensiones hay un cromosoma X normal. Las células son positivas para queratina por tinción con inmunoperoxidasa). Las células MDCK-RVL se sembraron en un matraz T175 y se dejaron crecer hasta una confluencia del 85-90 %. Al día siguiente, las células se lavaron dos veces con medio de infección. El reservorio de gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) se retiró de -80 °C y se descongeló en hielo. Las células se infectaron con el reservorio de virus a 0,01 MDI durante una hora en medio de infección. Al final de este período de incubación, el virus no unido se eliminó de las células. Las células se lavaron una vez con medio de infección y se cubrieron con medio de infección y se dejaron incubar durante 48 horas a 37 °C en una incubadora de aire/CO2 al 5 %. Después de la incubación, los matraces se congelaron a -80 °C durante un día. Al día siguiente, los matraces se descongelaron a temperatura ambiente y el sobrenadante del virus se centrifugó (2000 g, 10 min) y se combinó. El reservorio del virus se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C.

Se prepararon "sopas" víricas utilizando la línea celular A549 y células epiteliales bronquiales humanas primarias (HBEC). Para la preparación de sopas de A549, las células se sembraron en un matraz T175 y se dejaron crecer para obtener una confluencia del 85-90 %. Las células se lavaron dos veces con medio de infección. El reservorio de gripe A/Perth/16/2009 (H3N2) -WGC se retiró de -80 °C y se descongeló en hielo. Las células se infectaron con el reservorio de virus a 0,01 MDI durante una hora en medio de infección. El virus no unido se eliminó de las células al final del período de incubación y las células se lavaron una vez con medio de infección antes de recubrir con medio de infección. Las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C en una incubadora de CO2 al 5 %/aire. Después de la incubación, el medio ("sopa vírica") se recogió de todos los matraces, se centrifugaron (2000 g, 10 min) y se combinaron. La sopa vírica se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. Para la preparación de sopas de HBEC,

las células se pasaron (P-3 o P4) en matraces T-175 y se infectaron con el reservorio de gripe A/Perth/16/2009 (H3N2)-WGC a una MDI 0,01 durante una hora en medio de infección HBECs. Después de la incubación, se eliminó el virus y se lavaron las células con medio de crecimiento HBECs. A continuación, las células se superpusieron con medio de infección HBECs, durante 48 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %/aire. Al final de este período de incubación, la sopa vírica del HBEC se procesó de manera similar a la sopa A549.

La cinética de crecimiento vírico se optimizó para generar sopas víricas. Para determinar las curvas de crecimiento de varias etapas, se infectaron células A549 o HBEC con virus a una MDI de 0,01 DICT50/célula a 37 °C durante una hora. Después de la incubación, las células se lavaron y se cubrieron con los respectivos medios de infección. Las muestras se recolectaron para el título vírico y la medición de citocinas en varios puntos de tiempo durante 72 horas. Los títulos víricos se obtuvieron mediante DICT50 en células MDCK.

Antes de las pruebas experimentales, las preparaciones de sopa de A549 y HBEC se evaluaron mediante quimioluminiscencia electrogenerada para detectar la presencia de mediadores inflamatorios utilizando métodos recomendados por el proveedor (<https://web.archive.org/web/20160522190937/https://www.mesoscale.com/>). Se descubrió que ambas preparaciones de sopa contenían niveles elevados de las siguientes citocinas (IL-1-β, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα y RANTES; FIG. 5).

Se generaron datos *in vitro* a partir de células A549 para probar el efecto de la aplicación de sopa vírica A549 sobre la activación de p38, medido por análisis por transferencia de Western del estado de fosforilación de MAPK p38 en sí y de la diana de señalización aguas abajo, HSP27. Para la transferencia Western, las células confluentes se lavaron en PBS y se lisaron en RIPA con inhibidor de proteasa (Sigma-P8340), cócteles inhibidores de fosfatasa 2 y 3 (Sigma P5726 y P0044) e inhibidores de fosfatasa Na₃VO₄ y NaF en hielo. Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA y concentraciones iguales de cada muestra creada en tampón de muestra a 4X Laemmli (BIO-RAD 161-0747) con 2-mercaptoetanol. Las muestras se procesaron en un gel al 12 % y luego se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche en polvo al 5 %, luego se sondeó para fosfo-HSP27 (Ser82) (D1H2F6) XP® conejo (CST n.º 9709) o HSP27 (G31) ratón (CST n.º 2402). Los anticuerpos secundarios usados fueron IgG anti-conejo o ratón en cabra con peroxidasa AffiniPure (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories 111-035-003). Las membranas se separaron para volver a sondear usando el tampón de separación de transferencia Western Restore™ PLUS (Life Technologies n.º 46430). Las membranas se trataron con reactivo de detección por transferencia de Western Amersham ECL Prime (GE/Amersham n.º RPN2232) y se obtuvieron imágenes usando el sistema de obtención de imágenes ChemiDoc™ Touch (BIO-RAD). El análisis se realizó utilizando el programa informático Image Lab.

Se detectó la inducción de fosforilación en ambas enzimas, lo que indica que la MAPK p38 se activa después de la aplicación de sopa vírica A549 (FIG. 6). Adicionalmente, se demostró que la incubación con inhibidores de MAPK p38 (Dilmapimod y PH 797804) inhibe de forma dependiente de la dosis la inducción de la fosforilación de MAPK p38 y HSP27 por la sopa vírica A549 de los presentes inventores, confirmando que esta inducción es un proceso dependiente de MAPK p38 dentro de estas células epiteliales.

También se exploró el efecto de la sopa vírica de A549 sobre la producción de citocinas inflamatorias en células A549, medido por quimioluminiscencia electrogenerada. Tal como se muestra en la FIG. 6, se descubrió que la sopa A549 induce la producción de citocinas inflamatorias clave (IL-6 e IP-10) en mayor medida en comparación con la sopa de control de A549 no infectada. La aplicación de los dos inhibidores de MAPK p38 en células A549 antes de la aplicación de la sopa vírica A549 atenuó significativamente la liberación tanto de IL-6 como de IP-10 (FIG. 6). Estos datos demuestran que la liberación de mediadores inflamatorios en respuesta a la aplicación de la sopa vírica de A549 en células A549 es un proceso dependiente de MAPK p38.

Células endoteliales

La aplicación de sopa vírica de HBEC en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) se realizó para simular la interacción de mediadores inflamatorios que se producen a partir de células epiteliales infectadas con gripe en células endoteliales.

Se generaron datos *in vitro* a partir de células HUVEC para probar el efecto de la aplicación de sopa vírica HBEC sobre la activación de p38, medido por análisis por transferencia de Western del estado de fosforilación de MAPK p38 y de la diana de señalización aguas abajo, HSP27. Se detectó la inducción de fosforilación en HSP27, lo que indica que la MAPK p38 se activa después de la aplicación de la sopa vírica de HBEC (FIG. 5). Adicionalmente, se demostró que la preincubación con inhibidores de MAPK p38 (Dilmapimod y PH 797804) inhibe de forma dependiente de la dosis la inducción de la fosforilación de HSP27 por la sopa vírica de HBEC, confirmando que esta inducción es un proceso dependiente de MAPK p38 dentro de estas células endoteliales.

También se exploró el efecto de la sopa vírica de HBEC sobre la producción de citocinas inflamatorias en células HUVEC, medido por quimioluminiscencia electrogenerada (véase métodos). Tal como se muestra en la FIG. 5, se descubrió que la sopa vírica de HBEC induce la producción de citocinas inflamatorias clave (IL-6 e IP-10) en mayor medida en comparación con la sopa de HBEC no infectada. Se encontró que la incubación de células HUVEC con

los dos inhibidores de MAPK p38 antes de la aplicación de la sopa vírica de HBEC atenuaba significativamente la liberación inducida por la sopa vírica de HBEC tanto de IL-6 como de IP-10 (FIG. 7). Estos datos demuestran que la liberación de mediadores inflamatorios en respuesta a la aplicación de la sopa vírica de HBEC en células endoteliales HUVEC es un proceso dependiente de la MAPK p38.

5

Células inmunitarias

La aplicación de la sopa vírica de A549 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas se realizó para simular la interacción de mediadores inflamatorios que se producen a partir de células epiteliales infectadas con gripe en células inmunitarias. Las PBMC se aislaron de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes (Bøyum, A., Separation of leucocytes from blood and bone marrow, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968, 21, supl. 97).

10

Se generaron datos *ex vivo* a partir de células inmunitarias para probar el efecto de la aplicación de sopa vírica de A549 sobre la activación de p38 según lo medido por análisis por transferencia de Western (véase el método anterior) del estado de fosforilación de la diana de señalización aguas abajo de la MAPK p38, HSP27. Se detectó inducción de fosforilación en HSP27, lo que indica que la MAPK p38 se activa tras la aplicación de la sopa vírica de A549 (FIG. 8). Adicionalmente, se demostró que la preincubación con inhibidores de MAPK p38 (Dilmapiomod y PH 797804) inhibe de forma dependiente de la dosis la inducción de la fosforilación de HSP27 por la sopa vírica de A549, confirmando que esta inducción es un proceso dependiente de MAPK p38 dentro de estas células inmunitarias (FIG. 8).

15

20

También se exploró el efecto de la sopa vírica de A549 sobre la producción de citocinas inflamatorias en células inmunitarias, según se mide por quimioluminiscencia electrogenerada (véase lo anterior). Tal como se muestra en la FIG. 8, se descubrió que la sopa vírica de A549 induce la producción de citocinas inflamatorias clave (TNF α , IL-1- β , IL-6 y CXCL8) en mayor medida en comparación con la sopa de control no infectada A549. Se descubrió que la preincubación de inhibidores de MAPK p38 (Dilmapiomod y PH 797804) en células inmunitarias antes de la aplicación de la sopa vírica de A549 atenúa significativamente la liberación de TNF α inducida por la sopa vírica de A549, IL-1- β , IL-6 y CXCL8 (FIG. 8). Estos datos demuestran que la liberación de mediadores inflamatorios en respuesta a la aplicación de sopa viral A549 en células inmunes es un proceso promovido por la MAPK p38.

25

30

Se generaron datos adicionales *ex vivo* a partir de células inmunitarias mediante las cuales se comparó la inducción de mediadores inflamatorios en respuesta a la sopa vírica de A549 con estimulantes inflamatorios conocidos (anti-CD3 y LPS). Se descubrió que la inducción de TNF α , IL-1- β , IL-6 e IL-8 por la sopa vírica de A549 era mayor en comparación con estos estimulantes inflamatorios conocidos (FIG. 9).

35

Ejemplo 3: Actividad inhibidora de MAPK p38

La actividad inhibidora de la enzima de un compuesto se puede determinar mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) utilizando péptidos sintéticos marcados con fluoróforos tanto donantes como aceptores (Z-LYTE, Invitrogen).

40

Se diluye MAPK p38 gamma recombinante fosforilada (MAPK12: Millipore) en tampón HEPES, se mezcla con el compuesto candidato a las concentraciones finales deseadas y se incuba durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, se añaden el péptido FRET (2 μ M) y ATP (100 μ M) a la mezcla de enzima/compuesto y se incuban durante una hora. Se añade reactivo de desarrollo (proteasa) durante una hora antes de la detección en un lector de microplacas de fluorescencia. La proteasa de sitio específico solo escinde el péptido no fosforilado y elimina la señal FRET. Los niveles de fosforilación de cada reacción se calculan usando la proporción de emisión de cumarina (donante) sobre emisión de fluoresceína (aceptor) con proporciones altas que indican fosforilación alta y proporciones bajas, niveles de fosforilación bajos. El porcentaje de inhibición de cada reacción se calcula en relación con el control no inhibido y la concentración inhibidora del 50 % (valor de CI_{50}) luego se calcula a partir de la curva de concentración-respuesta.

50

Para la MAPK p38 alfa (MAPK14: Invitrogen), la actividad enzimática se evalúa indirectamente determinando la activación/fosforilación de la molécula aguas abajo, MAPKAP-K2. La proteína MAPK p38 α se mezcla con su diana MAPKAP-K2 inactiva (Invitrogen) y el compuesto candidato durante dos horas a temperatura ambiente. A continuación, se añaden el péptido FRET (2 μ M), que es una diana de fosforilación para MAPKAP-K2, y ATP (10 μ M) a la mezcla de enzimas/compuesto y se incuban durante una hora. Luego se añade el reactivo de desarrollo y la mezcla se incuba durante una hora antes de que la detección por fluorescencia complete el protocolo de ensayo.

55

Ejemplo 4: Inhibición de MAPK P38 (p38i) frente a inhibición de otras posibles dianas

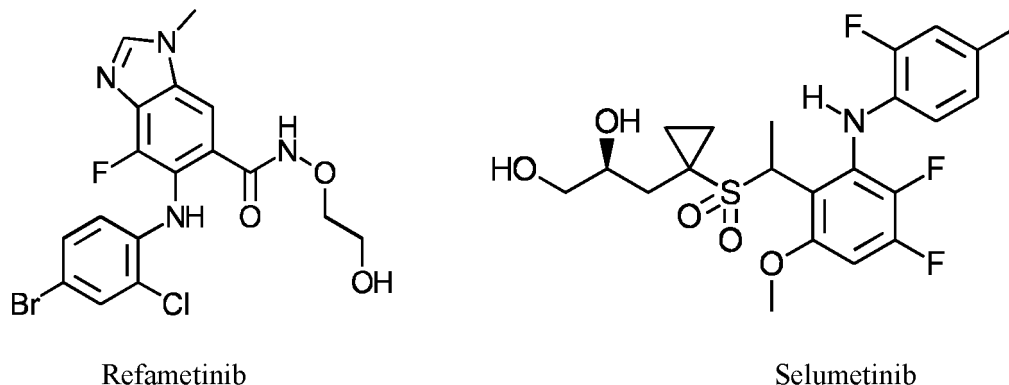
60

Tal como se indica en el Ejemplo 1 anterior, se identificaron varios nodos a los que se puede dirigir como diana en las 95 rutas destacadas por transcriptómica y bioinformática. Los experimentos de perfilado de compuestos del Ejemplo 2 muestran que p38i es eficaz para reducir la producción de liberación de mediadores inflamatorios en tipos de células relevantes para la patología de la gripe grave. Se descubrió que éste no era el caso de otros 9 nodos que se examinaron: PI3K, MEK, ERK, JNK, JAK/STAT, PKC, SRC, Btk y mTor. La inhibición farmacológica de ninguno

65

de estos 9 nodos dio un perfil de inhibición tan eficaz como p38i en células epiteliales, endoteliales e inmunitarias.

A modo de ejemplo, los datos que comparan p38i frente a la inhibición de proteína quinasa activada por mitógenos (MEK) (MEKi) por inhibidores de MEK Refametinib (Iverson C *et al.*, RDEA119/BAY 869766: a potent, selective, allosteric inhibitor of MEK1/2 for the treatment of cancer. *Cancer Res.*, 2009; 69: 6839-6847) y Selumetinib (Huynh H *et al.*, Targeted inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway with AZD6244 (ARRY-142886) in the treatment of hepatocellular carcinoma, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2007; 6:138-146) se presentan en la FIG. 10 de los dibujos adjuntos.



Ni Refametinib ni Selumetinib mostraron una inhibición dependiente de la dosis de la producción de IP10 en células endoteliales estimuladas con sopa vírica de HBEC y en realidad parecieron aumentar los niveles de IP10 a concentraciones de fármaco más altas (véase la FIG.10).

Se han propuesto varios dianas farmacológicas posibles para la gripe grave (por ejemplo, Liu Q *et al.*, 2015 y Fedson DS, 2009). La p38i también se comparó con compuestos de fármacos para una selección de estas dianas propuestas.

Para estos experimentos, se comparó PH797804 frente a corticosteroide (metil prednisolona), macrólido (azitromicina), agonista de PPAR (pioglitazona), inhibidor de PDE4 (Roflumilast), inhibidor de NFkB (EVP4593) y estatina (pravastatina) a cuatro concentraciones de fármaco (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1000 nM) en células endoteliales (HUVEC estimuladas con sopa vírica de HBEC) o células inmunitarias (PBMC más granulocitos estimulados con la sopa vírica de A549 tal como se describe en el Ejemplo 2 anterior).

Los efectos de la administración del compuesto farmacológico sobre la producción de IP-10, IL-8 y MCP-1 a partir de células endoteliales y sobre la producción de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α a partir de células inmunitarias se ensayaron usando quimioluminiscencia electrogenerada. En células inmunitarias, el tratamiento farmacológico con corticosteroides y macrólidos mostró una inhibición dependiente de la dosis de las cuatro citocinas analizadas, mientras que la p38i mostró una inhibición dependiente de la dosis de solo tres de los cuatro. El perfil inhibitorio de los otros fármacos probados fue variable y no coincidió con el de los corticosteroides, macrólido o p38i. Los resultados se resumen en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Comparación de los efectos inhibidores de los compuestos farmacológicos para las dianas propuestas en la bibliografía para la gripe grave frente a la p38i. Se aislaron PBMC más granulocitos tal como se describe en el Ejemplo 2 y se estimularon con la sopa vírica de A549. Los niveles de citocinas secretadas se analizaron mediante quimioluminiscencia electrogenerada y los valores de CI50 e iMáx se calcularon a partir de las respuestas a la dosis utilizando un ajuste de regresión no lineal utilizando un paquete de programa informático científico de gráficos y estadísticas 2D (programa informático GraphPad PRISM® versión 6.07). Cuando los datos no mostraron una inhibición dependiente de la dosis, no se calcularon los valores de CI50 e iMáx (casillas vacías).

	Inhibidor de p38 PH797804		Corticosteroide metilprednisolona		Macrófido Azitromicina		Agonista de PPAR Pioglitazona		Inhibidor de PDE4 Roflumilast		Inhibidor de NFkB QNZ (EVP4593)		Estatina Pravastatina	
	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)
IL1B	9,7	79 %	8,4	77 %	0,5	50 %								
IL8	2,3	87 %	8,4	90 %	0,8	46 %	0,1	37 %	0,09	31 %	0,2	47 %		
TNFa	3,9	91 %	20,2	79 %	86,9	63 %			10,8	74 %	43,6	37 %		
IL6			36,6	57 %	119	45 %	0,02	41 %						

Las gráficas de inhibición de IL1-b y TNFa para los compuestos ensayados se muestran en las FIG. 11 y 12.

Con células endoteliales, en contraste con las células inmunitarias, solo los inhibidores de p38 y NFkB mostraron una inhibición dependiente de la dosis de las tres citocinas ensayadas. Ninguno de los otros fármacos probados
5 mostró un efecto inhibidor comparable. Los resultados se resumen en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Comparación de los efectos inhibidores de los compuestos farmacológicos para las dianas propuestas en la bibliografía para la gripe grave frente a la p38i. Las células HUVEC se estimularon con sopa vírica de HBEC. Los niveles de citocinas secretadas se analizaron mediante quimioluminiscencia electrogenerada y los valores de CI50 e iMáx se calcularon a partir de las respuestas a la dosis utilizando un ajuste de regresión no lineal con un paquete de programa informático científico de gráficos y estadísticas 2D (programa informático GraphPad PRISM®) versión 6.07). Cuando los datos no mostraron una inhibición dependiente de la dosis, no se calcularon los valores de CI50 e iMáx.

	Inhibidor de p38 PH797804		Corticosteroide metilprednisolona		Macrófido Azitromicina		Agonista de PPAR Pioglitazona		Inhibidor de PDE4 Roflumilast		Inhibidor de NFκB QNZ (EVP4593)		Estatina Pravastatina	
	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)	CI50 (nM)	iMáx (%)
1P10	7,5	88 %									3,3	72 %	78	35 %
IL8	28,9	86 %									6,5	60 %		
MCP1	13,1	36 %									3,84	44 %		

Las gráficas de inhibición para IP10 e IL8 se muestran en las FIG. 13 y 14.

Basado en los resultados obtenidos en los experimentos con células inmunitarias, la superioridad de la p38i frente a los otros fármacos fue inesperada, especialmente metilprednisolona, que se usa de forma rutinaria en entornos clínicos para tratar una variedad de enfermedades inflamatorias (por ejemplo, asma) y se prescribe comúnmente para la gripe grave, aunque existe incertidumbre sobre su posible beneficio o daño (Rodrigo C *et al.*, Corticosteroids as adjunctive therapy in the treatment of influenza, Cochrane Database of Systematic Reviews, 2016, Número 3. Art. N.º: CD010406. DOI:10.1002/14651858.CD010406.pub2]. NFkB está aguas abajo de p38, por lo que el perfil de inhibición observado no es inesperado.

Ejemplo 5: Los niveles de varias citocinas en suero de pacientes hospitalizados por gripe grave aumentaron significativamente en relación con los individuos infectados por gripe sin gripe grave.

Los niveles de citocinas en muestras de suero de 30 sujetos hospitalizados con gripe grave durante la temporada de gripe de 2015 y de 28 sujetos sanos infectados después de la inoculación intranasal con el virus de la gripe A/H3N2 Perth/16/2009 se analizaron utilizando quimioluminiscencia electrogenerada. En el caso anterior, se analizó una muestra de suero preparada a partir de una muestra de sangre recogida 24-72 horas después de que el sujeto ingresara en el hospital. En el caso de este último, el suero se analizó a partir de muestras de sangre recogidas a 12 intervalos predeterminados (día -1 a día 28). Se observó un aumento significativo de ocho citocinas en los sujetos sanos hospitalizados frente a los infectados: IL-8, IL-7, IL-16, Eotaxina, IP10, MCP1, MCP4 y VEGF. Los resultados de cuatro de estos se muestran en la FIG. 15.

Los resultados muestran que los sujetos hospitalizados se distinguen de los sujetos infectados sanos en términos de sus perfiles de citocinas séricas.

Abreviaturas

ATP	Adenosin trifosfato
Btk	Tirosina quinasa de Bruton
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares)
GSK	Glaxo Smith-Kline
HBEC	Células epiteliales bronquiales humanas
HSP27	Proteína 27 de choque térmico
HUVEC	Células endoteliales vasculares humanas
CI50	Concentración inhibitoria semimáxima
iMáx	Inhibición máxima (como %)
IL1-b	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IPA	Análisis de las vías Ingenuity
JAK/STAT	Janus quinasa/transductor de señal y activador de la transcripción
JNK	c-Jun quinasa en N-terminal
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos 1
MDCK	Riñón canino de Madin Darby
MEK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEKi	Inhibición de MEK (por fármaco)
mTOR	Diana mecanicista de la rapamicina
NFkB	Factor nuclear kappa-potenciador de cadena ligera de linfocitos B activados
MAPK P38	Proteínas quinasas activadas por mitógeno P38
P38i	inhibición de p38 (por fármaco)
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PDE4	Fosfodiesterasa 4
PKC	Proteína quinasa
PPAR	Receptor activado por proliferación de peroxisomas
SRC	Src quinasa
TNFa	Factor de necrosis tumoral alfa

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso en el tratamiento de gripe grave en un paciente humano; en donde la gripe grave se **caracteriza por** síntomas que persisten o reaparecen durante más de 2 días sin signos de resolución, y el inhibidor de la MAP quinasa p38 inhibe la liberación de mediadores proinflamatorios de las células endoteliales e inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias de células inmunitarias.
2. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde los síntomas que persisten o reaparecen durante más de 2 días sin signos de resolución incluyen fiebre (una temperatura superior a 100 °F/38 °C), letargo, dolor, congestión, tos, congestión nasal, secreción nasal o congestión o inflamación de las vías respiratorias superiores.
3. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha gripe grave se **caracteriza por** hipercitocinemia y, opcionalmente, dicha hipercitocinemia implica niveles elevados de una o más citocinas seleccionadas de TNF α , IL-6, IL-8 e IP10.
4. Un inhibidor de la MAP quinasa p38 para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 3, que inhibe la liberación de uno o más de los siguientes desde las células endoteliales:
- i) citocinas proinflamatorias; y
 - ii) IP10;
- y, opcionalmente, el inhibidor de la MAP quinasa p38 presenta una inhibición dependiente de la dosis de la liberación de citocinas de las células endoteliales.
5. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde dicha gripe grave se **caracteriza por** síntomas o signos de hipoxemia o insuficiencia cardiopulmonar.
6. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 5, en donde dichos síntomas o signos de hipoxemia o insuficiencia cardiopulmonar incluyen uno o más de disnea, taquipnea, cianosis, presión arterial baja e hipoxia, en donde opcionalmente dicha gripe grave se **caracteriza por** taquipnea (frecuencia respiratoria ≥ 30 para edades ≥ 12 años, frecuencia ≥ 40 para edades de 6 a 12 años, frecuencia ≥ 45 para edades de 3 a 6 años, frecuencia ≥ 50 para edades de 1 a 3 años).
7. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 5, en donde dicha gripe grave se **caracteriza por** cualquier malestar al respirar o disnea.
8. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde dicha gripe grave se **caracteriza por** uno o más de los siguientes: comorbilidad con un trastorno respiratorio inferior sin infiltrados pulmonares radiológicos; síntomas o signos que sugieren trastornos neuromusculares periféricos y/o del SNC; deshidratación grave; fatiga y/o letargo; la presencia de infiltrado pulmonar radiológico; evidencia de infección vírica sostenida; infección bacteriana secundaria invasiva; un trastorno o inflamación del tracto respiratorio inferior; e insuficiencia de un órgano o multiorgánica o choque séptico.
9. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde el paciente se **caracteriza por** uno o más de los siguientes:
- i) el paciente es un lactante o un anciano o una mujer embarazada; y
 - ii) una o más comorbilidades subyacentes predisponen al paciente a una gripe grave.
10. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde el inhibidor de la MAP quinasa p38 se administra al paciente bajo uno o más de los siguientes regímenes:
- i) durante un período máximo de 1 a 5 días; y
 - ii) una vez al día.
11. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso tal como se reivindica en cualquier reivindicación anterior, en donde el inhibidor de la MAP quinasa p38 se selecciona de 2-(4-Clorofenil)-4-(fluorofenil)-5-piridin-4-il-1,2-dihidropirazol-3-ona, RWJ-67657 (RW Johnson Pharmaceutical Research Institute); RDP-58 (Sangstat Medical); Scios-469 (talmapimod) (Scios, J&J); inhibidor MKK3/MKK6 (Signal Research Division); análogo de SB-210313, SB-220025 (Aventis), SB-238039, HEP-689, SB-203580 (Leo), SB-239063 (R.W. Johnson), SB-239065, SB-242235 (SmithKline Beecham Pharmaceuticals); VX-702 y VX-745 (Vertex Pharmaceuticals); AMG-548 (Amgen); Inhibidor de la quinasa p38 Astex (Bayer); BIRB-796 (Doramapimod) (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals); RO 4402257 (Pamapimod) (Roche, Palo Alto), Inhibidor de la MAP quinasa p38 de Celltech (Celltech Group plc.); FR-167653 (Fujisawa Pharmaceutical); SB-681323 (Dilmapimod) (GlaxoSmithKline) y SB-281832 (GlaxoSmithKline plc, Scios); inhibidor de la MAP quinasa de LEO Pharmaceuticals (LEO Pharma A/S); inhibidor de la MAP quinasa p38 de Merck & Co. (Merck research Laboratories); SC-040 y SC-XX906 (Monsanto); antagonistas de la adenosina A3 de Novartis

(Novartis AG); inhibidor de la MAP quinasa p38 (NovartisPharma AG); CP-64131 (Pfizer); CNI-1493 (Picower Institute for Medical Research); RPR-200765A (Phone-Poulenc Rorer); e inhibidor de la MAP quinasa p38 y Ro-320-1195 de Roche (Roche Bioscience), AIK-3, AKP-001 (ASKA Pharma), antibiótico LL Z1640-2, ARRY-614, ARRY-797, AS-1940477, AVE-9940, AZD-7624, BCT-197, BIRB-1017BS, BMS-582949, CAY10571, CBS-3595, CCT-196969, CCT-241161, CDP-146, CGH 2466, CHR-3620, edisilato de clormetiazol, CM PD-1, Doramapimod, EO 1428, FY-101C, FX-005, GSK-610677 (GlaxoSmithKline), HE-3286, HSB-13, JX 401, KC-706 (Kemia), KC-706 (ITX-5061) (iTherX Inc.), LEO-15520, LEO-1606, Losmapimod (GlaxoSmithKline), LP-590, LY-30007113, LY2228820, M L 3403, OX-27-NO, NP-202, pexmetinib, PF-03715455 (Pfizer), PH-797804 (Pfizer), PS-540446, ralimetinib, regorafenib, RO-3201195, RWJ 67657, RWJ-67657, SB 202190 (Leo), SB 203580 (Pfizer), SB 203580 clorhidrato (Pfizer), SB202190, SB202190 clorhidrato (Roche), SB-681323 (Tanabe Seiyaku), SB-856553, SC-80036, SCD-282, SCIO-323, SCIO-469, SD-06, semapimod, SKF 86002, SX 011, SYD-003, TA-5493, TAK 715 (Takeda Pharma), inhibidor de quinasa Tie2 (Tanabe Pharma), TOP-1210, TOP-1630 y VGX-1027.

12. Inhibidor de MAPK para el uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inhibidor de la MAP quinasa p38 es UR-13870.

13. Un inhibidor de MAPK p38 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el inhibidor de la MAP quinasa p38 se selecciona de: 8-(2,6-difluorofenil)-2-(1,3-dihidroxiopropan-2-ilamino)-4-(4-fluoro-2-metilfenil)pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona (Dilmapimod), GSK-610677; 6-[5-(ciclopropilcarbamoil)-3-fluoro-2-metilfenil]-N-(2,2-dimetilpropil)piridina-3-carboxamida (Losmapimod); 5-[(2-cloro-6-fluorofenil)acetilamino]-3-(4-fluorofenil)-4-(4-pirimidinil)isoxazol (AKP-001), KC-706, (1-[5-*terc*-butil-2-(3-cloro-4-hidroxifenil)pirazol-3-il]-3-[[2-[[3-2-(2-hidroxietilsulfanil)fenil]-[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridin-6-il]sulfanil]fenil]metil]urea) (PF-03715455), (3-[3-bromo-4-[(2,4-difluorofenil)metoxi]-6-metil-2-oxopiridin-1-il]-N,4-dimetilbenzamida) (PH-797804); RV-7031; 2-metoxi-1-{4-[(4-{3-[5-(*terc*-butil)-2-(*p*-tolil)-2H-pirazol-3-il]ureido)-1-naftiloxi]metil]-2-piridilamino}-1-etanona (RV-568) o 2-metoxi-1-[4-(4-{3-[5-(*terc*-butil)-2-(*p*-tolil)-2H-pirazol-3-il]ureido)-1-naftiloxi]-2-piridilamino]-1-etanona; y 4,6-bis(*p*-fluorofenil)-2-metil-5-(4-piridil)-1,2,7-triaza-2H-indeno.

14. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de la gripe grave en un paciente humano, comprendiendo la composición un inhibidor de la MAPK p38; en donde la gripe grave se **caracteriza por** síntomas que persisten o reaparecen durante más de 2 días sin signos de resolución, y el inhibidor de la MAP quinasa p38 inhibe la liberación de mediadores proinflamatorios de las células endoteliales e inhibe la liberación de citocinas proinflamatorias de células inmunitarias.

15. Una composición farmacéutica para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 13, en donde los síntomas que persisten o reaparecen durante más de 2 días sin signos de resolución incluyen fiebre (una temperatura superior a 100 °F/38 °C), letargo, dolor, congestión, tos, congestión nasal, secreción nasal o congestión o inflamación de las vías respiratorias superiores.

16. Una composición farmacéutica para uso tal como se reivindica en la reivindicación 13 o en la reivindicación 14, en donde el inhibidor de la MAP quinasa p38 es UR-13870.

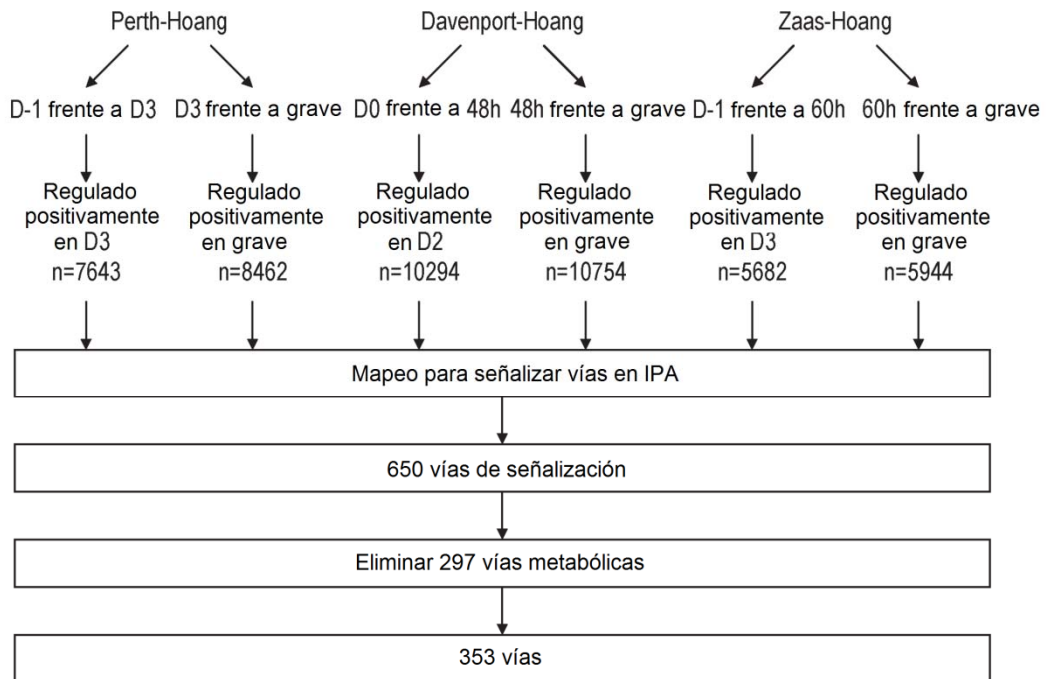


FIG. 1

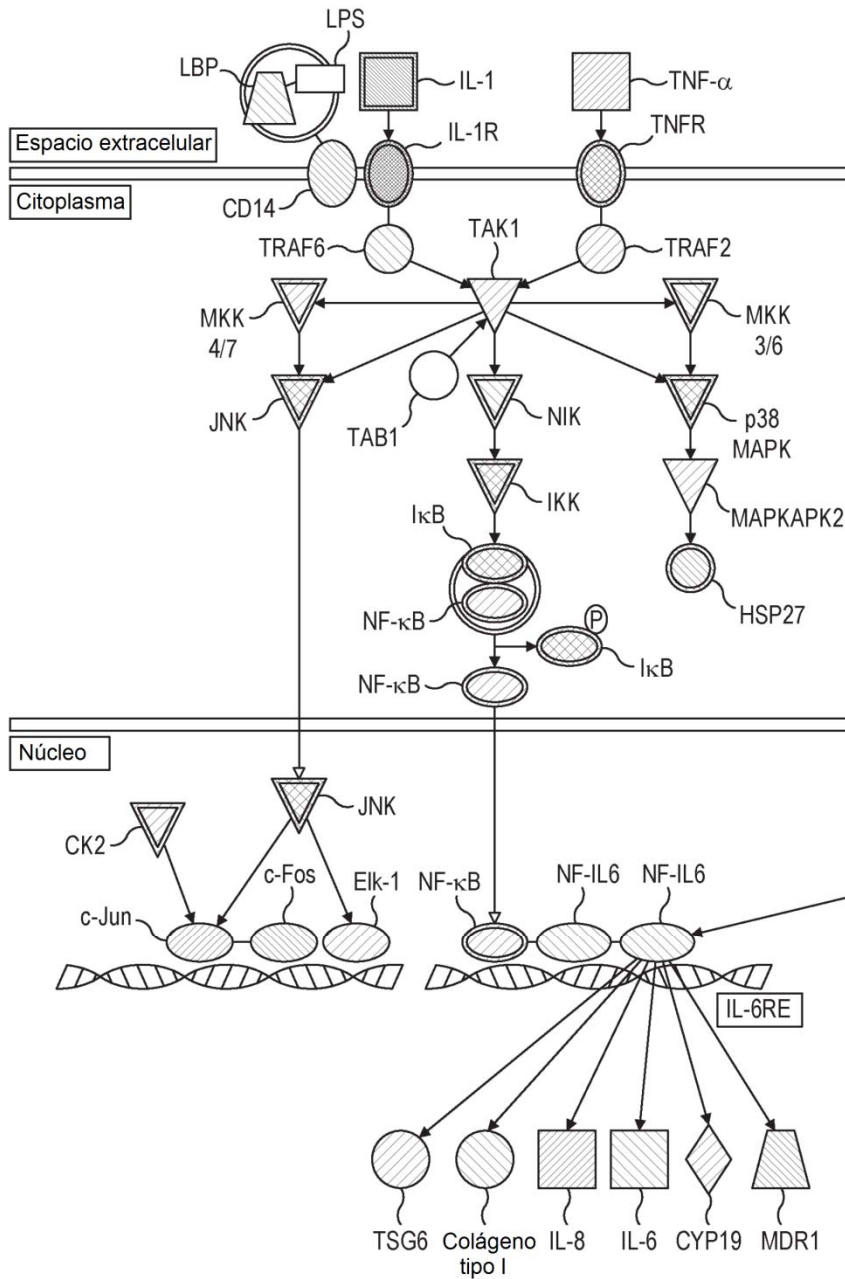


FIG. 2

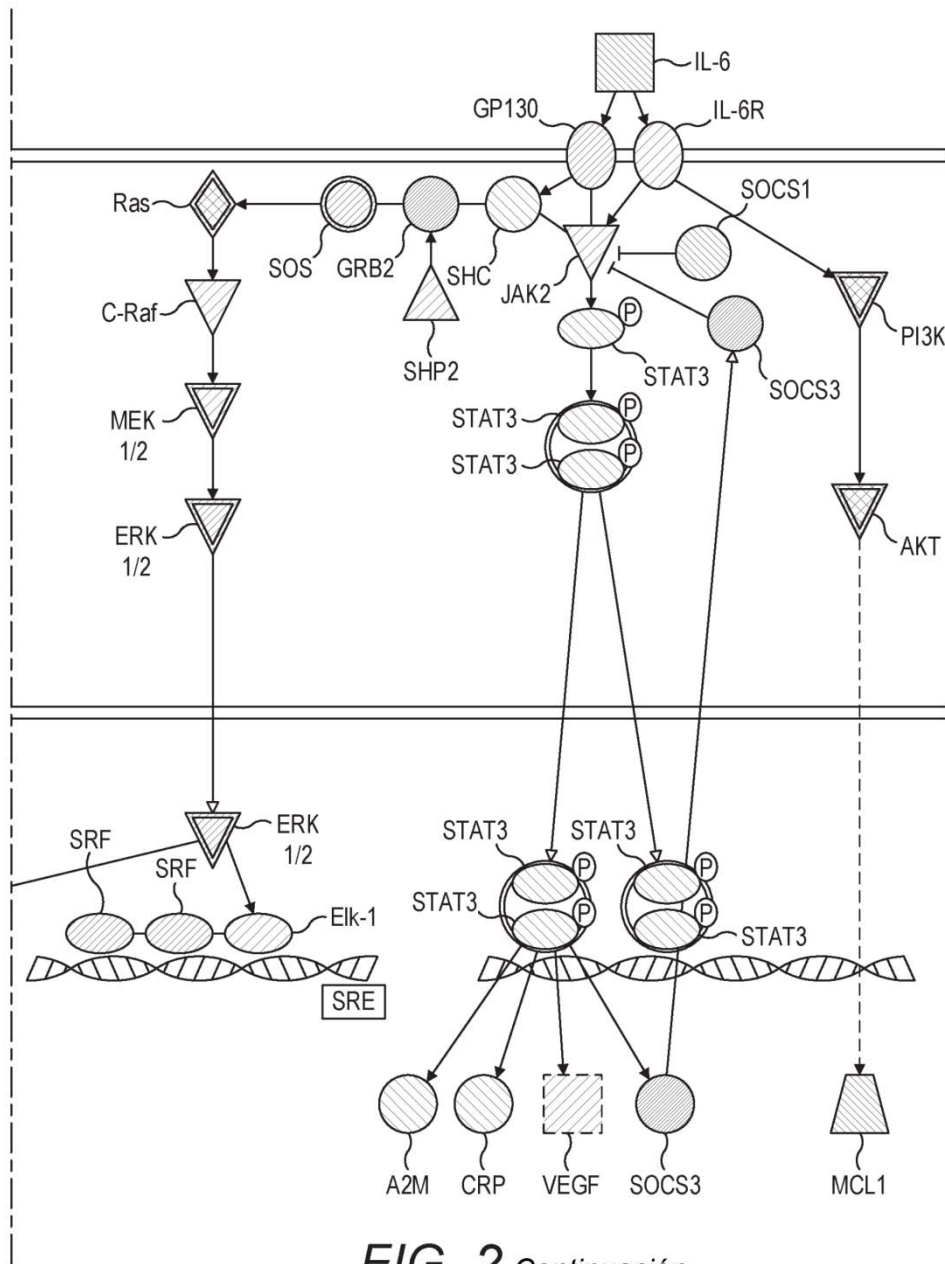


FIG. 2 *Continuación*

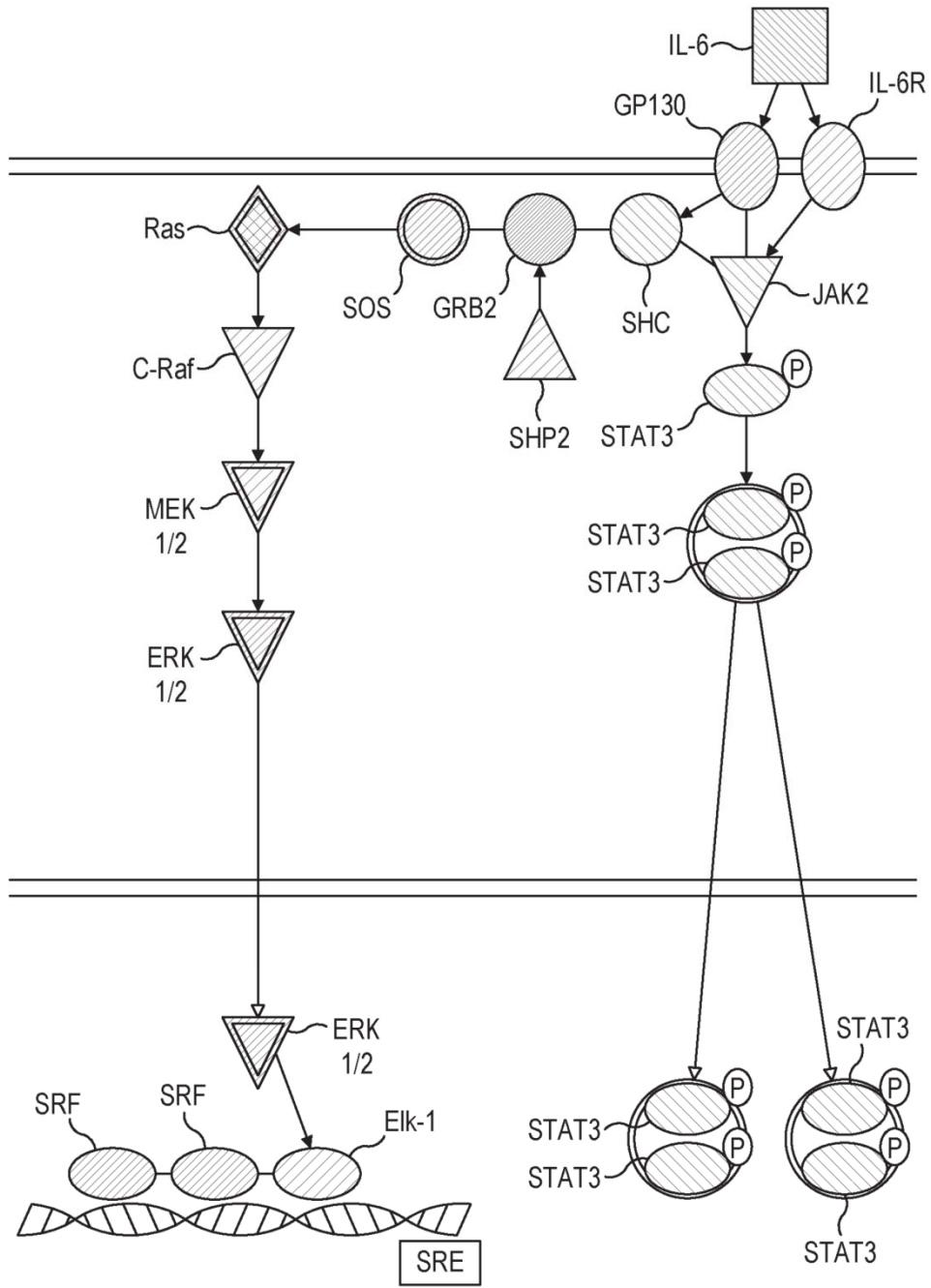


FIG. 3

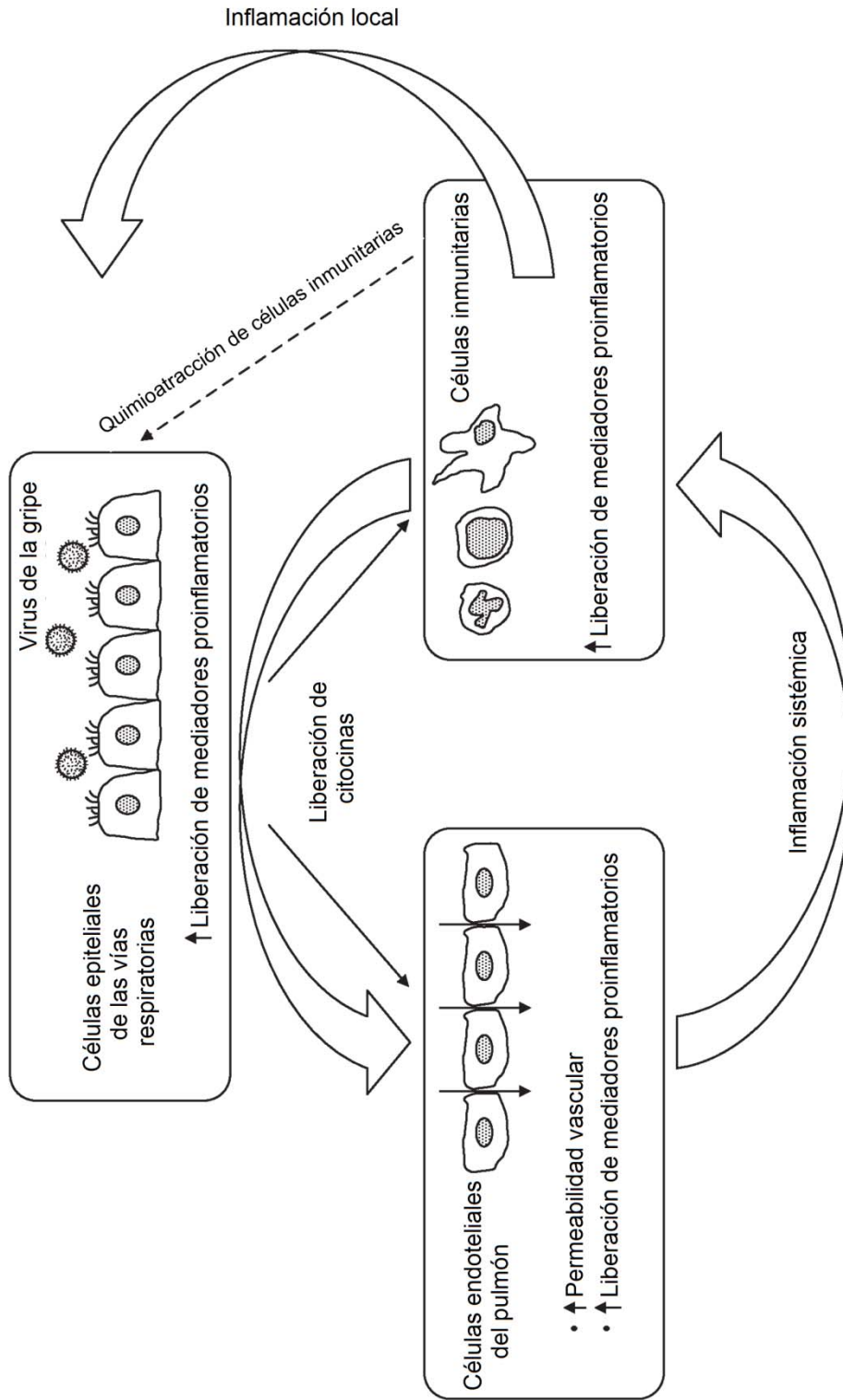


FIG. 4

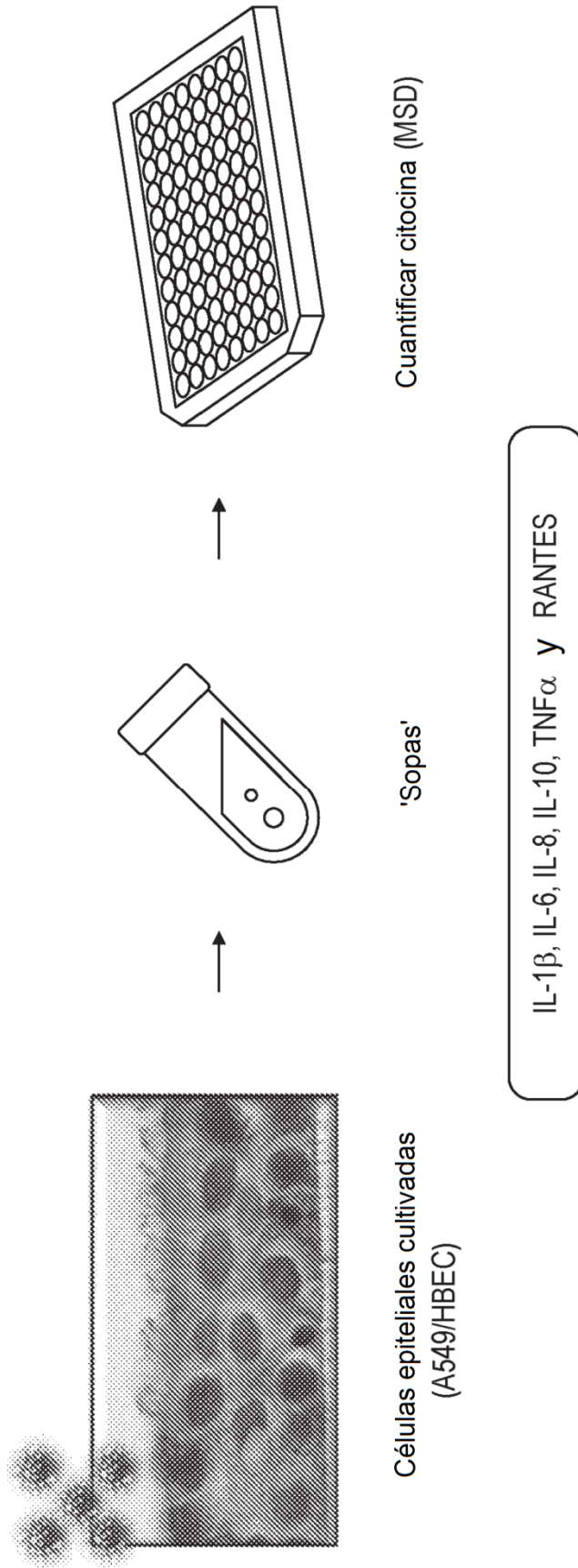


FIG. 5

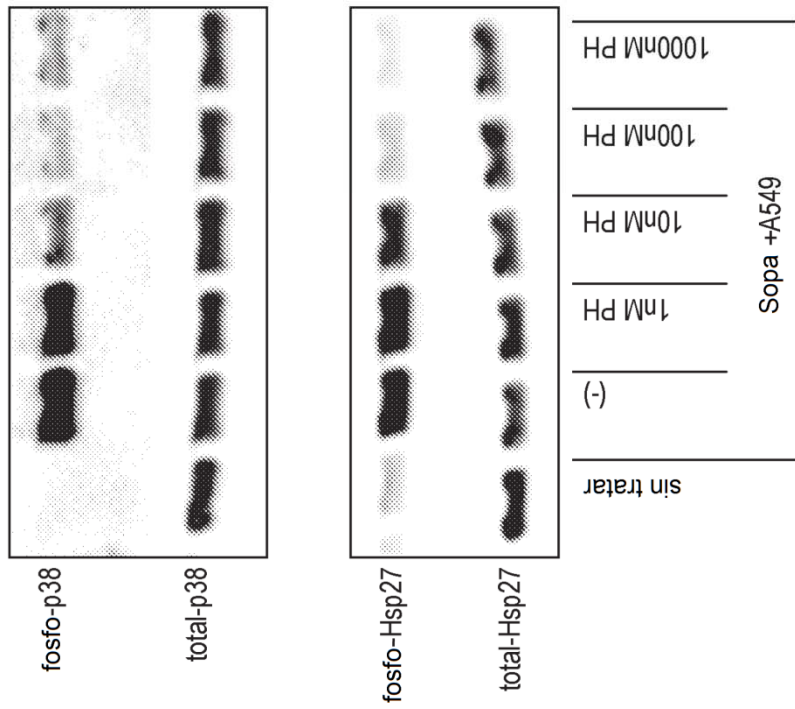
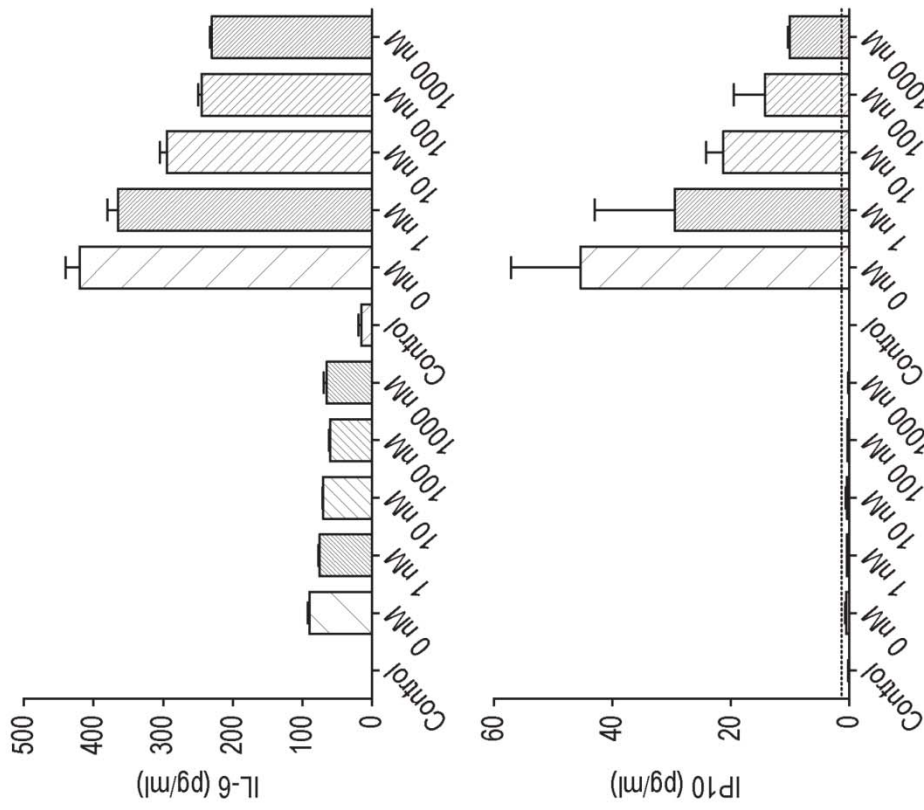


FIG. 6

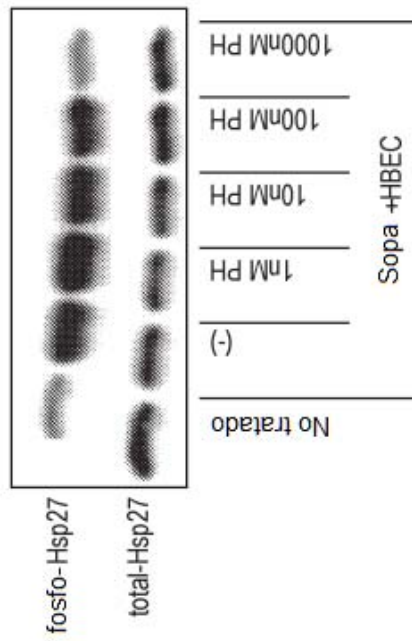
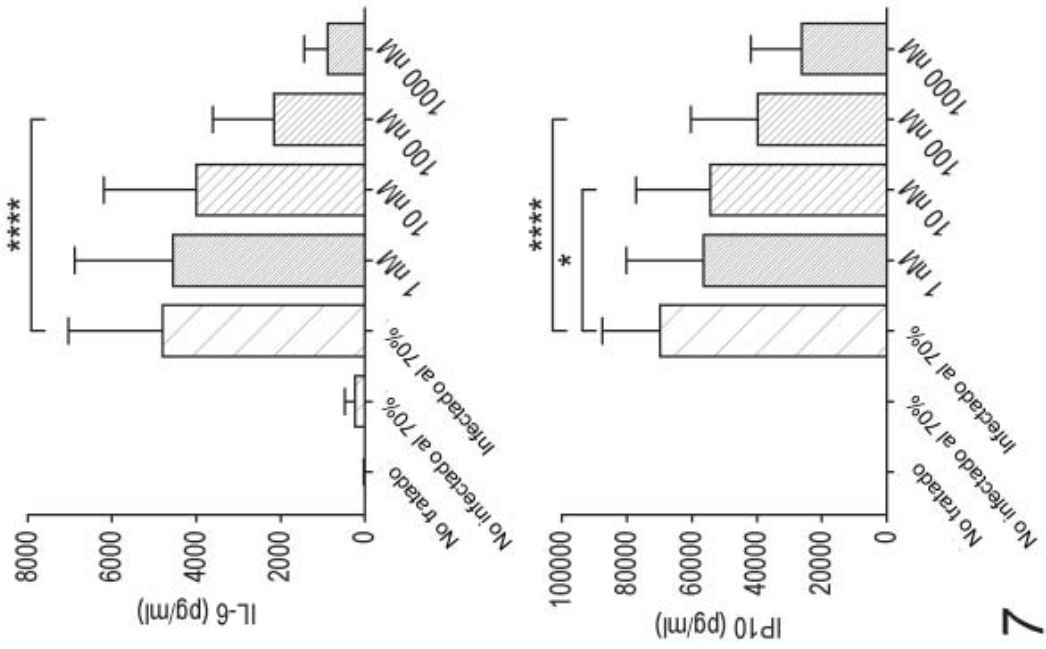


FIG. 7

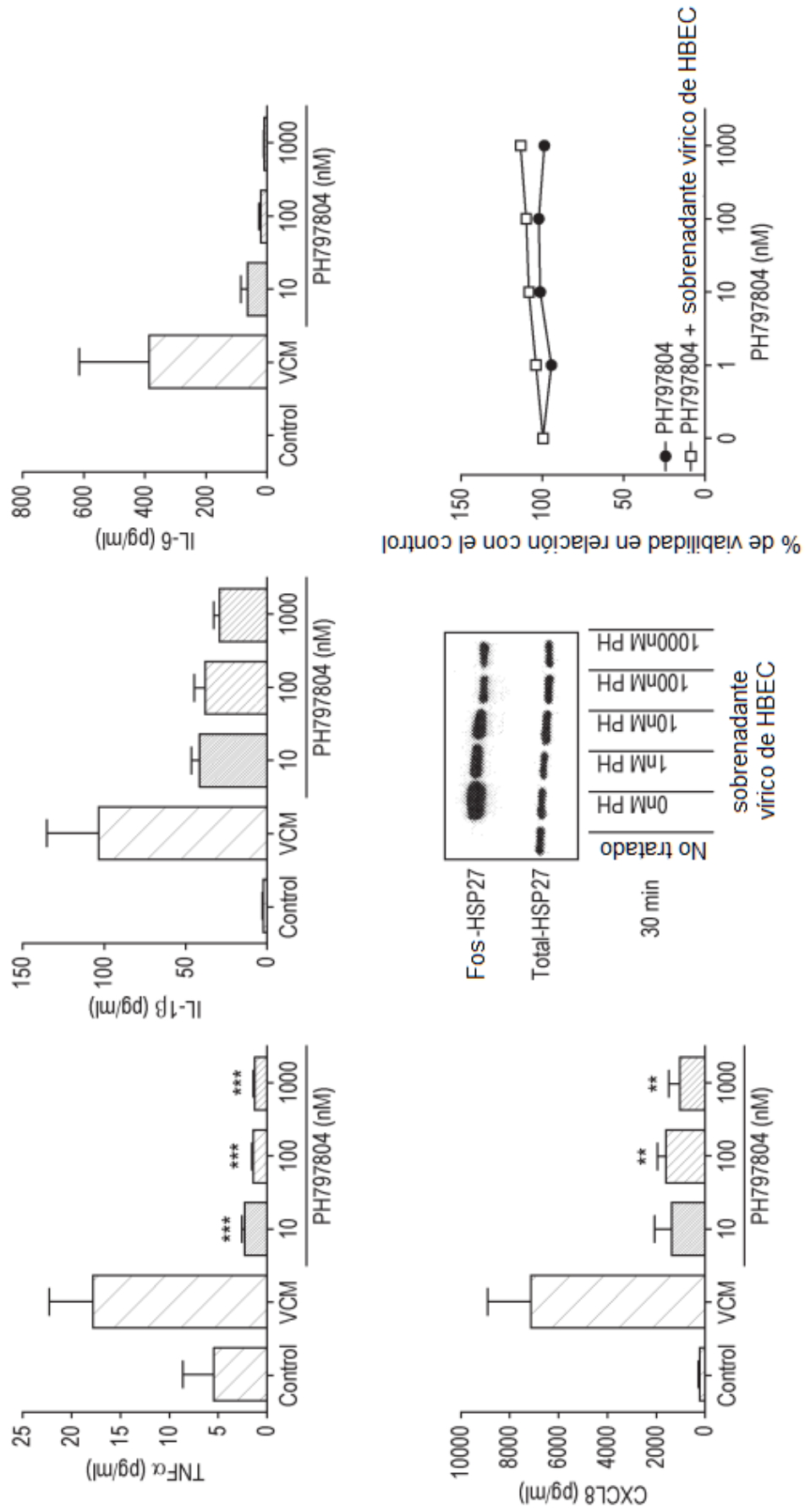


FIG. 8

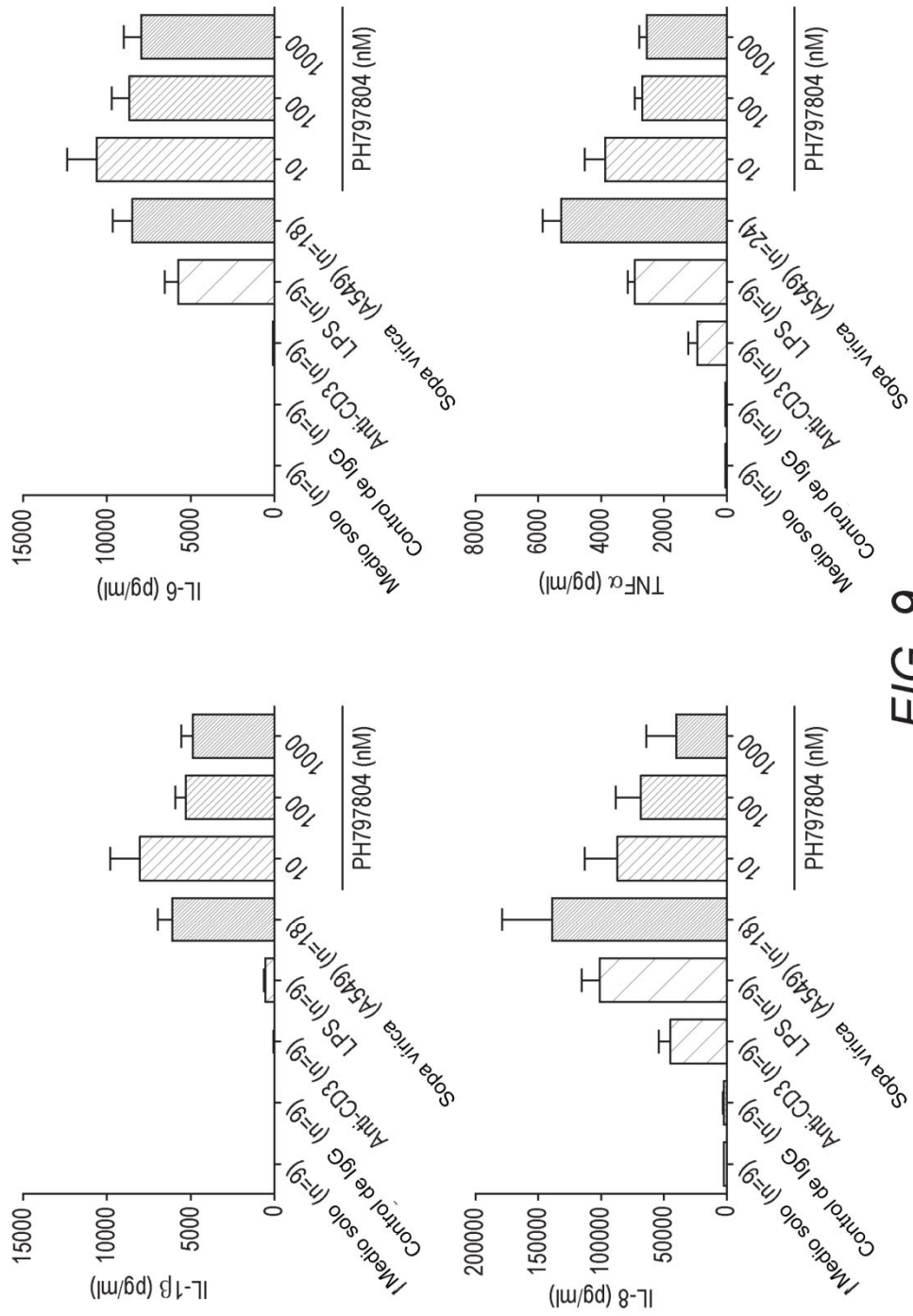


FIG. 9

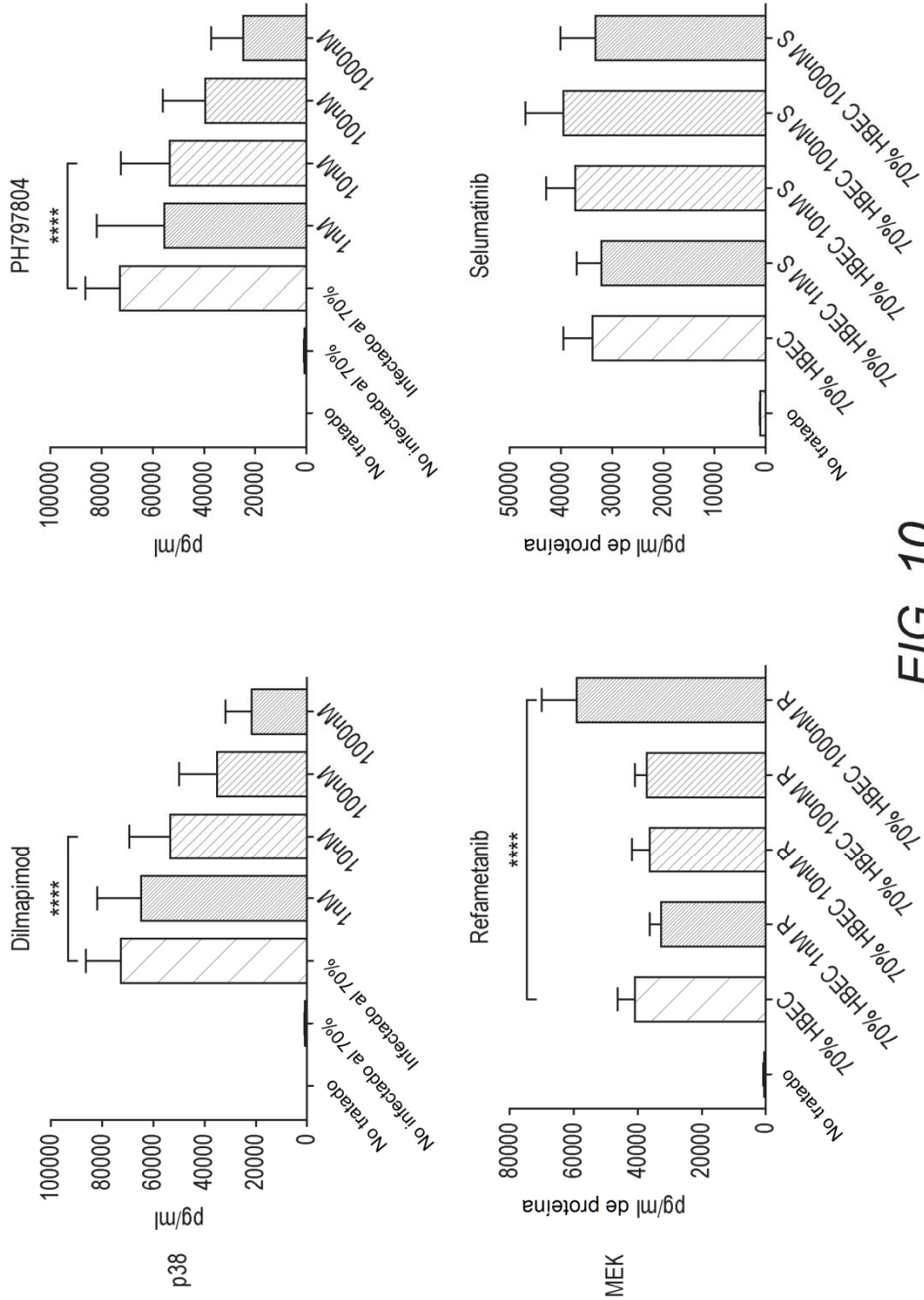


FIG. 10

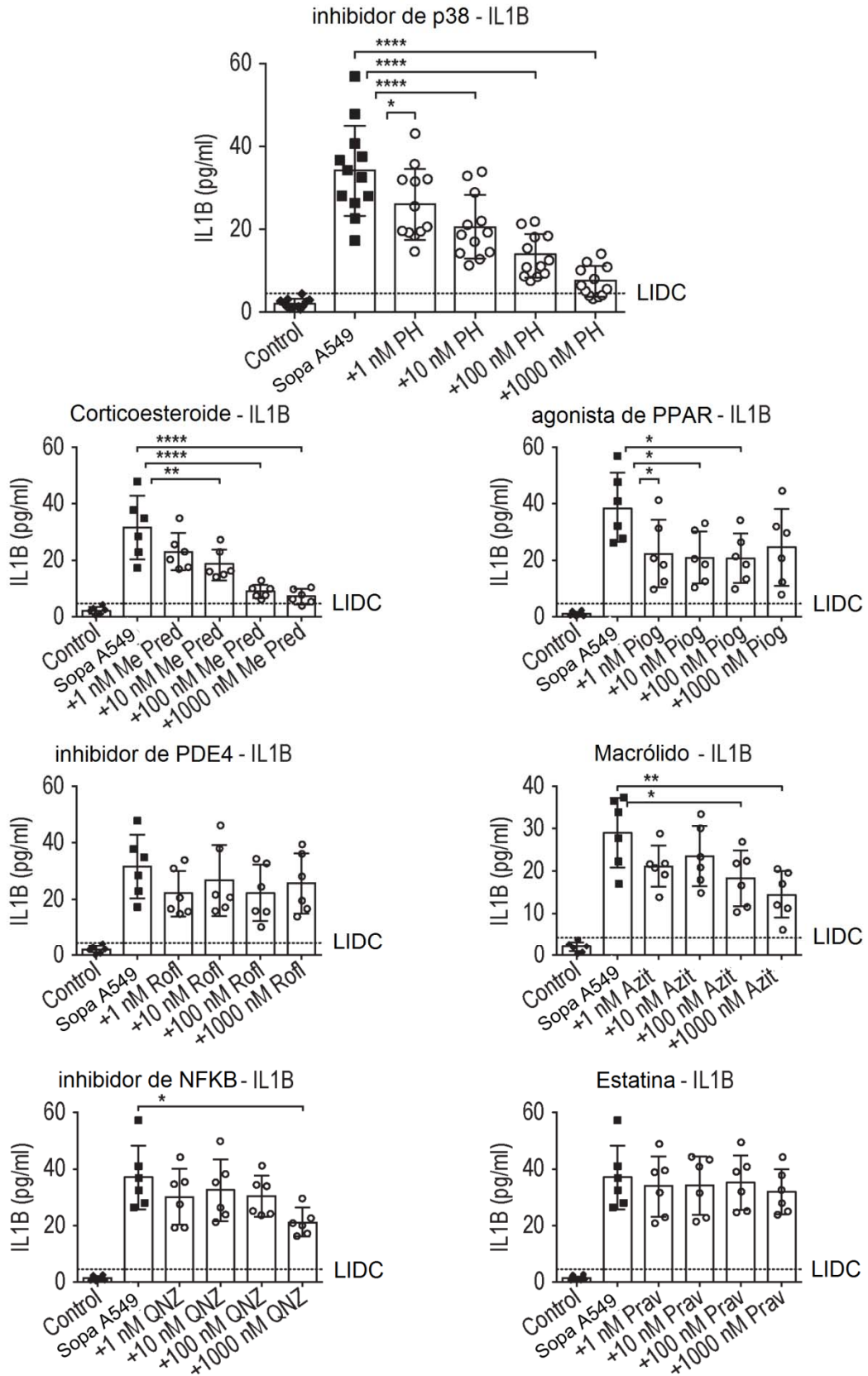


FIG. 11

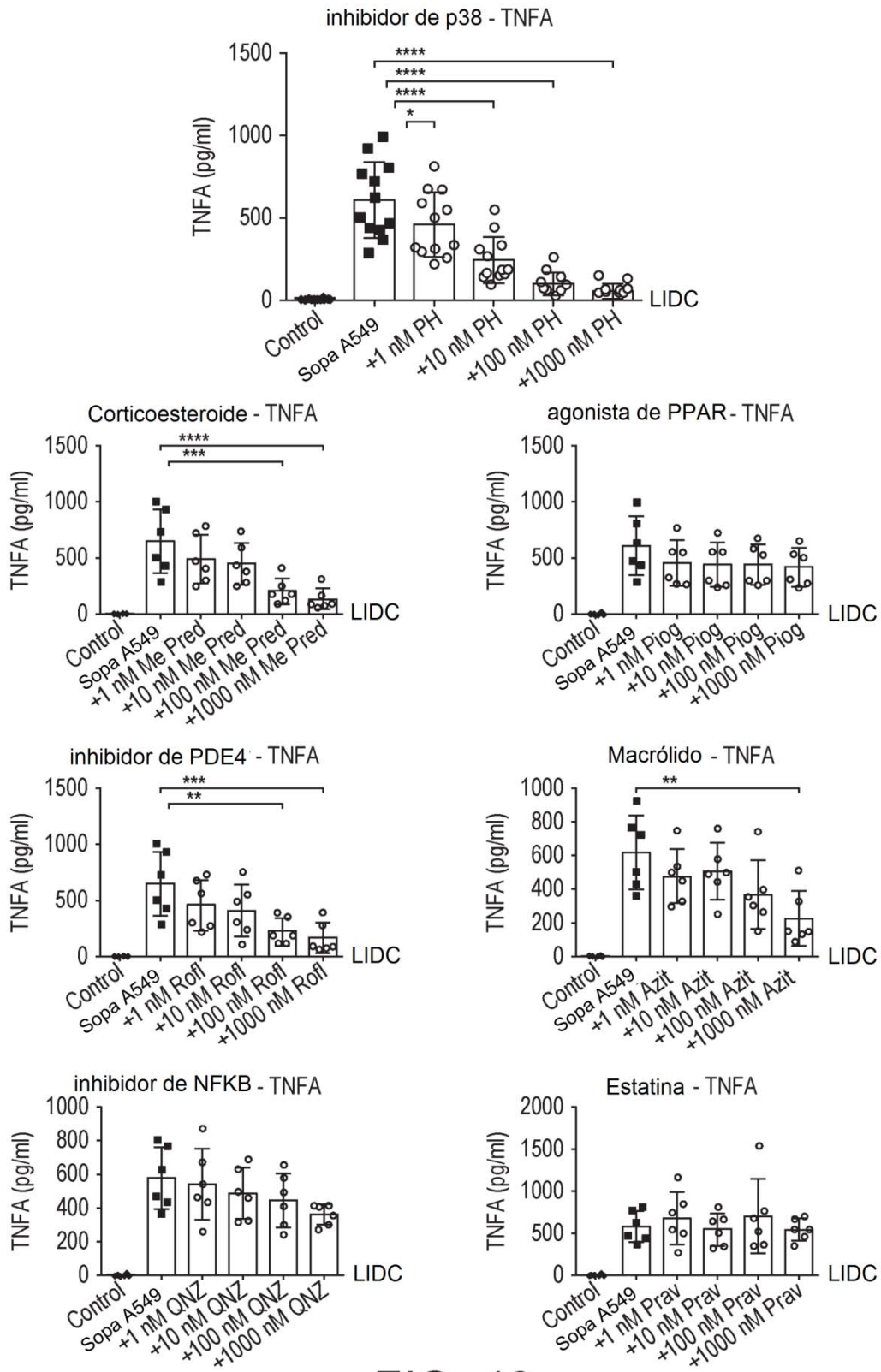


FIG. 12

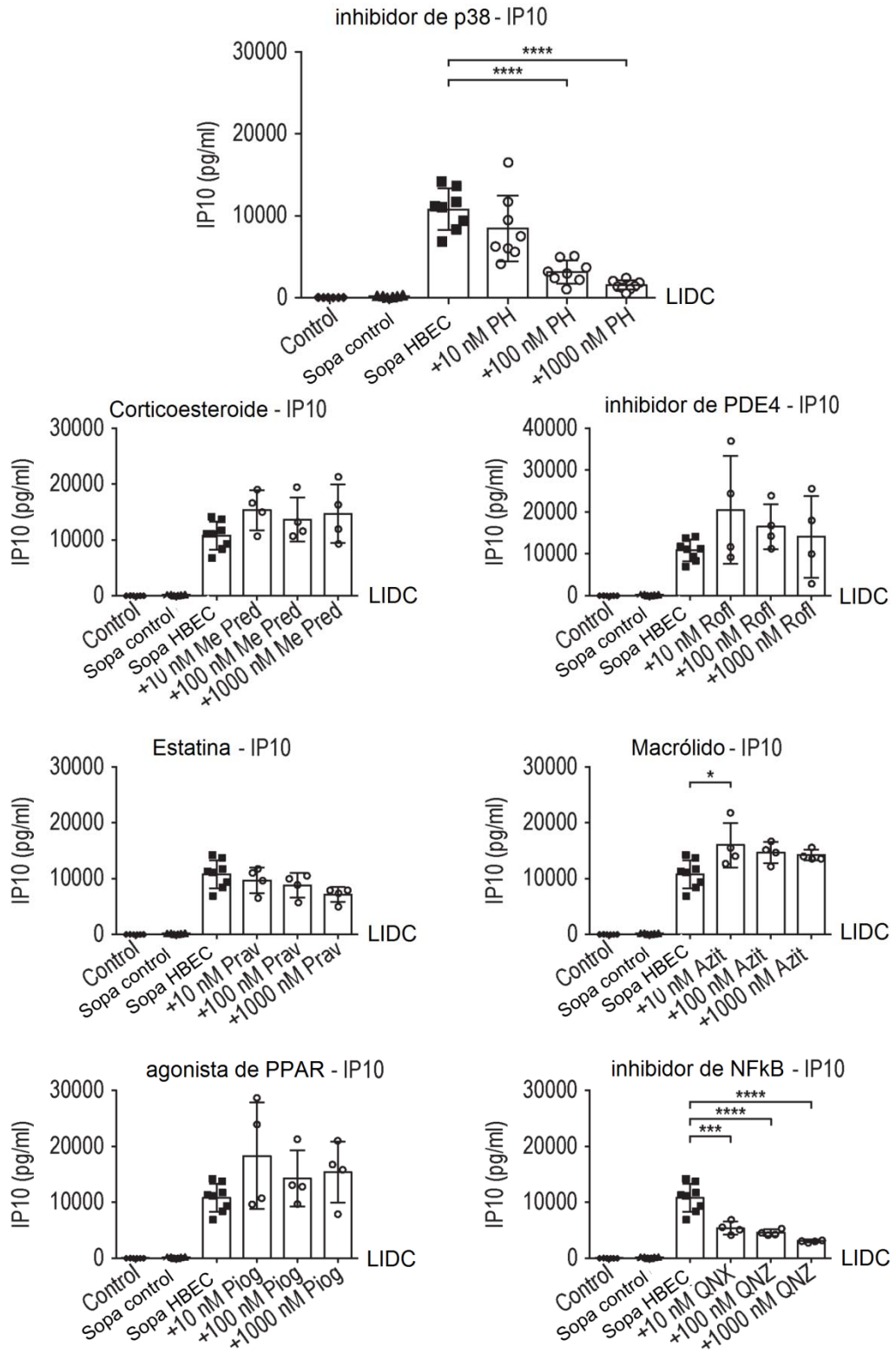


FIG. 13

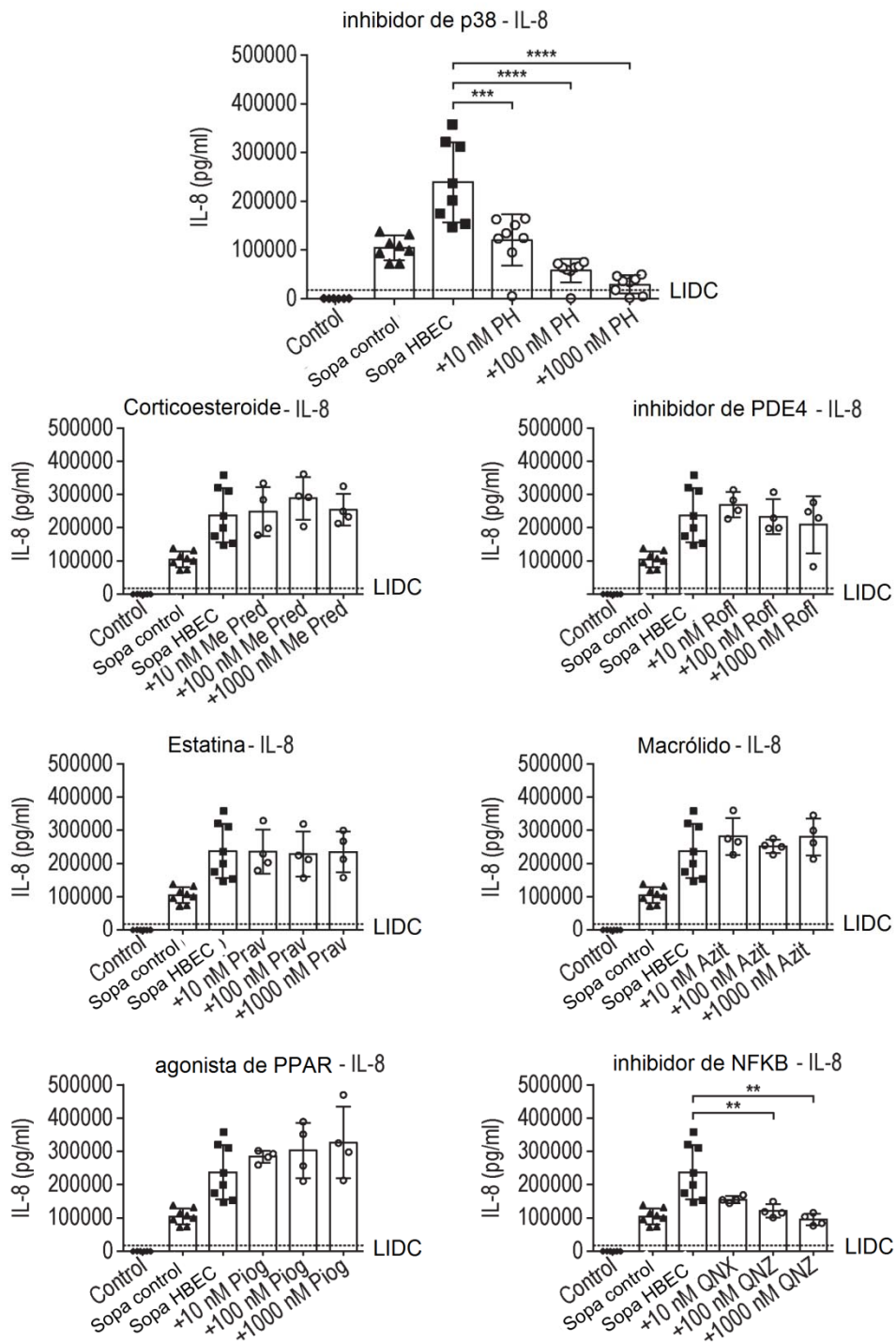


FIG. 14

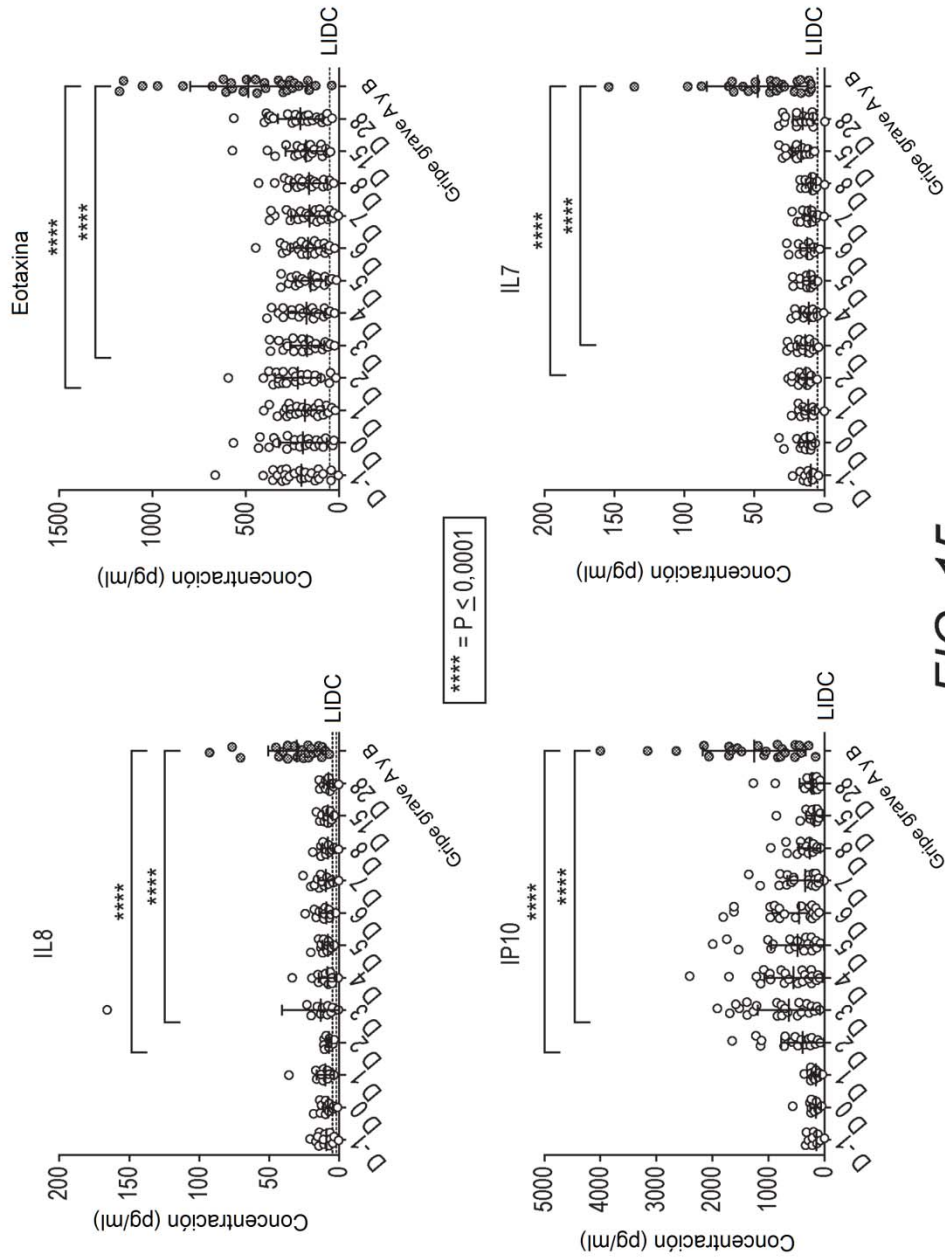


FIG. 15