



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 914 949**

⑮ Int. Cl.:

A61K 31/7012 (2006.01)
A61K 31/215 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/425 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2010 PCT/US2010/039638**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **29.12.2010 WO10151577**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2010 E 10792599 (2)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022 EP 2445349**

⑮ Título: **Compuestos y métodos para tratar la gripe**

⑩ Prioridad:

26.06.2009 US 220891 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.06.2022

⑦ Titular/es:

**ROMARK LABORATORIES, L.C. (100.0%)
3000 Bayport Drive Suite 200
Tampa, FL 33607, US**

⑦ Inventor/es:

**ROSSIGNOL, JEAN-FRANCOIS y
SEMPLE, J., EDWARD**

⑦ Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 914 949 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

Compuestos y métodos para tratar la gripe

5 **Antecedentes**

Esta invención se refiere a métodos y a productos que emplean tiazolidas para su uso en un método de tratamiento y prevención de infección gripal.

- 10 La gripe, una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa que afecta a todos los grupos de edades, provoca aproximadamente 36.000 muertes y más de 226.000 hospitalizaciones al año en los Estados Unidos solo. Clasificados (como tipos A, B y C), según las diferencias antigenicas en su nucleoproteína y proteína de matriz, los virus de la gripe son virus de ARN de cadena negativa con envoltura; el tipo A es el más importante clínicamente. Los muchos subtipos del virus de la gripe A difieren en sus dos glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina ("HA") y la neuraminidasa ("NA"), que son las principales dianas de la respuesta inmunitaria protectora, y se marcan según el tipo de hemaglutinina (indicado con un número H) y neuraminidasa (indicado con un número N). HA y NA varían de manera continua como resultado de las variaciones antigenicas menores y de las variaciones antigenicas mayores. Se conocen diecisésis subtipos (o "serotipos") de H y nueve subtipos de N.
- 15 20 La aparición de cepas del virus de la gripe A altamente patógenas, tales como la nueva gripe porcina H1N1, representa una amenaza particularmente grave para la salud humana global. Además de la vigilancia y el diagnóstico temprano, los esfuerzos para controlar las cepas de la gripe emergentes han enfatizado el desarrollo tanto de vacunas eficaces como de nuevos fármacos antivirales.
- 25 30 35 La hemaglutinina del virus de la gripe A es una glicoproteína trimérica que contiene 3-9 secciones de glicosilación unidas a N por subunidad, dependiendo de la cepa. La HA se sintetiza inicialmente y se glicosila en el núcleo en el retículo endoplásmico como un precursor de 75-79 kDa (HA0) que se ensambla para dar homotrímeros unidos de manera no covalente. Los trímeros se transportan rápidamente al complejo de Golgi y alcanzan la membrana plasmática, donde la inserción de HA inicia el proceso de ensamblaje y la maduración de las partículas virales recién formadas. Justo antes o coincidiendo con la inserción en la membrana plasmática, cada subunidad de trímero se escinde de manera proteolítica para dar dos glicoproteínas, HA1 y HA2, que permanecen unidas por un enlace disulfuro.

40 ROSSIGNOL JEAN FRANCOIS ET AL: "Thiazolides, a New Class of Anti-influenza Molecules Targeting Viral Hemagglutinin at the Post-translational Level", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 284, no. 43, octubre de 2009 (2009-10), páginas 29798-29808, XP002685734, ISSN: 0021-9258 se refiere a la actividad antigripal de nitazoxanida.

45 El documento US 2004/0242518 A1 se refiere a un producto terapéutico contra la gripe.

40 **Sumario**

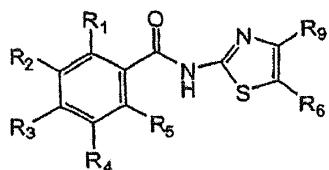
50 Esta invención se refiere a productos para su uso en un método de tratamiento y prevención de infección viral mediante el bloqueo de la maduración de la hemaglutinina viral en una etapa anterior a la resistencia a la digestión con endoglicosidasa. El tratamiento y la prevención se llevan a cabo mediante la administración de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, solo o en combinación con otros agentes. Los compuestos de fórmula I presentan actividad antiviral a través del nuevo mecanismo de bloquear selectivamente la maduración de la proteína de superficie viral HA, alterando de ese modo el transporte intracelular y la inserción en la membrana plasmática de la célula huésped. Los resultados preliminares sugieren que los compuestos de fórmula I constituyen una nueva clase de fármacos antivirales eficaces contra la infección por la gripe A. La presente invención también proporciona un producto que contiene un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad eficaz de un agente antiviral adicional, o de un inmunoestimulante, o de una vacuna, como preparación combinada para su uso independiente, simultáneo o secuencial en terapia antiviral.

55 **Breve descripción**

60 Esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas y a preparaciones combinadas que emplean tiazolidas de fórmula I para su uso en un método de tratamiento y prevención de infección gripal mediante la inhibición de la maduración de HA del virus de la gripe. En las preparaciones combinadas y composiciones farmacéuticas para su uso en un método de tratamiento según la presente invención, el agente antiviral puede comprender de 1 a 4 compuestos o preparaciones, y también pueden incluir una vacuna y/o un inmunoestimulante.

65 En una realización, esta invención proporciona o contempla una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable o un éster del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.

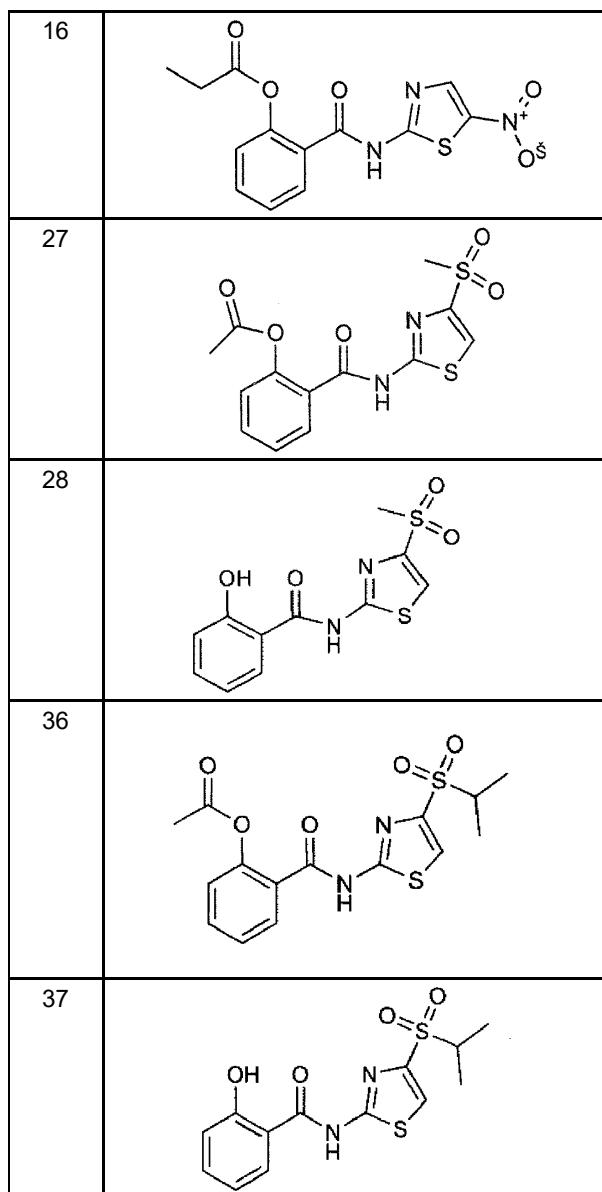
- 5 En una realización más específica, esta invención proporciona o contempla una combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de neuraminidasa para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.
- 10 En otra realización más específica, esta invención proporciona o contempla una combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inmunoestimulante para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.
- 15 En otra realización más específica, esta invención proporciona o contempla una combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un interferón pegilado para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.
- 20 En otra realización más específica, esta invención proporciona o contempla una combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una proteína de fusión de sialidasa recombinante para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.
- 25 En otra realización más específica, esta invención proporciona o contempla una combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una vacuna para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.
- 30 En otra realización más específica, esta invención proporciona o contempla una combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un oligonucleótido antisentido para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.
- 35 En otra realización más específica, esta invención proporciona o contempla una combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y otro agente antiviral tal como se definió anteriormente, en la que los dos agentes van a administrarse de manera sustancialmente simultánea.
- 40 En otra realización más específica, esta invención proporciona o contempla una combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y otro agente antiviral tal como se definió anteriormente, en la que los dos agentes van a administrarse de manera secuencial.
- 45 En otra realización, esta invención proporciona una combinación que comprende un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con el análogo de adamantano amantadina o rimantadina para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.
- 50 En otra realización, esta invención proporciona un kit o envase de combinación, útil para tratar la gripe, que comprende un compuesto de fórmula I tal como se define en la reivindicación principal, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de neuraminidasa para su uso en un método tal como se define en las reivindicaciones.
- 55 Específicamente, la presente invención se refiere a las siguientes realizaciones:
1. Una composición farmacéutica que comprende
 - i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, o de una sal o un éster del mismo,



Fórmula I

- 5 en la que uno de R₁, R₂, R₃ es OH o OC(=O)Q, en el que Q es R₇, OR₇ o NHR₇; R₇ es alquilo inferior, arilo o heteroarilo y está opcionalmente sustituido; R₄, R₆ y el resto de R₁, R₂ y R₃, son H; y o bien R₆ es NO₂ y R₉ es H o bien R₆ es H y R₉ es SO₂R₁₂, en el que R₁₂ es alquilo inferior, arilo o heteroarilo y está opcionalmente sustituido;
- 10 en la que el término "inferior" significa que tiene 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono; y
- ii) un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en un método de prevención o tratamiento de una infección gripe mediante el bloqueo de la maduración de hemaglutinina viral en una etapa anterior a la resistencia a la digestión con endoglicosidasa.
- 15 2. La composición farmacéutica para su uso en un método según el punto 1, en la que el compuesto de fórmula I es nitazoxanida, tizoxanida, o una sal o un éster de las mismas.
- 20 3. La composición farmacéutica para su uso en un método según el punto 1, en la que el compuesto de fórmula I es un compuesto mostrado en la siguiente tabla, fórmulas 1-3, 14-16, 27, 28, 36 y 37:

N.º	Compuesto
1	
2	
3	
14	
15	



4. La composición farmacéutica para su uso en un método según uno cualquiera de los puntos 1-3, en la que el compuesto de fórmula I se administra en combinación con un inhibidor de neuraminidasa, una vacuna, un inmunoestimulante, un análogo de adamantano, una proteína de fusión de sialidasa recombinante, un oligonucleótido antisentido o un interferón pegilado; en la que el análogo de adamantano se selecciona del grupo que consiste en amantadina y rimantadina.

5. La composición farmacéutica para su uso en un método según uno cualquiera de los puntos 1-3, en la que el compuesto de fórmula I se administra en combinación con una vacuna y un inmunoestimulante.

10 6. La composición farmacéutica para su uso en un método según el punto 4 ó 5, en la que el inhibidor de neuraminidasa se selecciona del grupo que consiste en oseltamivir, zanamivir, permivir, RWJ-270201, DANA y CS-8958, y el inmunoestimulante es polioxidonio.

15 7. La composición farmacéutica para su uso en un método según uno cualquiera de los puntos 4-6, en la que la combinación se administra de manera secuencial o de manera sustancialmente simultánea.

8. La composición farmacéutica para su uso en un método según el punto 1, en la que la infección gripe está provocada por un virus seleccionado de H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 y H10N7.

20 9. Un kit que comprende (a) un compuesto de fórmula I según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (b) un inhibidor de neuraminidasa o un inmunoestimulante para su uso en un método de tratamiento de la gripe.

10. El kit para su uso en un método según el punto 9, en el que el inhibidor de neuraminidasa se selecciona del grupo que consiste en oseltamivir, zanamivir, permivir, RWJ-270201, DANA y CS-8958, y el inmunoestimulante es polioxidonio.

- 5 **Descripción detallada**
- Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados indicados.
- 10 A menos que se indique lo contrario, el término "un(a)" significa "uno o más".
- 15 A menos que se indique lo contrario, el término "uno o más sustituyentes", tal como se usa en el presente documento, se refiere a desde uno hasta el máximo número de sustituyentes posible basándose en el número de sitios de unión disponibles.
- 20 El término "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a revertir, aliviar, inhibir la evolución de o prevenir el trastorno o estado al que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal estado o trastorno. El término "tratamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere al acto de tratar, tal como se define "tratar" inmediatamente antes.
- 25 Los términos "combinación", "terapia de combinación" y "terapia conjunta" abarcan la administración de un compuesto de fórmula I y otro agente como parte de un régimen de tratamiento específico destinado a proporcionar un efecto beneficioso a partir de la acción coordinada de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, la acción conjunta farmacocinética o farmacodinámica resultante de la combinación de agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo normalmente a lo largo de un periodo de tiempo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada).
- 30 Generalmente, no se pretende que la "terapia de combinación" abarque la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de regímenes de monoterapia independientes que de manera incidental y arbitraria dan como resultado las combinaciones de la presente invención. Se pretende que la "terapia de combinación" incluya la administración de agentes terapéuticos o bien de manera sustancialmente simultánea o bien de manera secuencial. La administración de manera sustancialmente simultánea puede lograrse, por ejemplo, mediante la administración de una cápsula individual que contiene una razón fija de agentes terapéuticos o mediante la administración de cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración tanto secuencial como sustancialmente simultánea de agentes terapéuticos puede efectuarse mediante cualquier vía apropiada incluyendo, pero sin limitarse a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de la membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada puede administrarse mediante inyección intravenosa mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación pueden administrarse por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, todos los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral o todos los agentes terapéuticos pueden administrarse mediante inyección intravenosa. El orden en el que se administran los agentes terapéuticos puede ser crítico o puede no ser crítico. La "terapia de combinación" también puede abarcar la administración de los agentes terapéuticos tal como se describió anteriormente en combinación adicional con otros principios biológicamente activos (tales como, pero sin limitarse a, diferentes agentes antivirales, vacunas o inmunoestimulantes), así como terapias no farmacológicas, incluyendo complementos nutricionales.
- 35 El término "sales" se usa en su sentido más amplio. Por ejemplo, el término sales incluye sales de hidrógeno y sales de hidróxido con iones del presente compuesto. En algunas realizaciones, el término sal puede ser una subclase denominada sales farmacéuticamente aceptables, que son sales de los presentes compuestos que tienen una actividad farmacológica y que no son ni biológica ni de otro modo no deseables. En todas las realizaciones, las sales pueden formarse con ácidos, tales como, sin limitación, hidrógeno, haluros, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato y undecanoato. En todas las realizaciones, las sales pueden formarse con bases, tales como, sin limitación, hidróxido, sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de litio, sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio, sales de magnesio, sales de aluminio, sales con bases orgánicas tales como amoniaco, metilamina, dietilamina, etanolamina, diciclohexilamina, N-metilmorfolina, N-metil-D-glucamina, y sales con aminoácidos tales como arginina y lisina. Los grupos que contienen nitrógeno básicos pueden cuaternizarse con agentes que incluyen haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; y haluros de aralquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo.
- 40 Los términos "sal terapéuticamente aceptable" y "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usan en el presente
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

documento, representan tanto sales como formas zwitteriónicas de los compuestos de la presente invención que son solubles o dispersables en agua o aceite; que son adecuadas para el tratamiento de enfermedades sin toxicidad, irritación y respuesta alérgica indebidas; que son compatibles con una relación beneficio/riesgo razonable; y que son eficaces para su uso previsto. Las sales pueden prepararse durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos o independientemente haciendo reaccionar el compuesto apropiado en forma de la base libre con un ácido adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, L-ascorbato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato (besilato), bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, digluconato, formiato, fumarato, gentisato, glutarato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hipurato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isetionato), lactato, maleato, malonato, DL-mandelato, mesitlenosulfonato, metanosulfonato, naftilenosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfonato, picrato, pivalato, propionato, piroglutamato, succinato, sulfonato, tartrato, L-tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, para-toluenosulfonato (p-tosilato) y undecanoato. Además, los grupos básicos en los compuestos de la presente invención pueden cuaternizarse con cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; y bromuros de bencilo y fenetilo. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición terapéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como oxálico, maleico, succínico y cítrico. También pueden formarse sales mediante la coordinación de los compuestos con un ion de metal alcalino o alcalinotérreo. Por tanto, la presente invención contempla sales de sodio, potasio, magnesio y calcio de los compuestos de la presente invención, y similares.

Pueden prepararse sales de adición básicas durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos haciendo reaccionar un grupo carboxilo, fenol o similar con una base adecuada tal como un hidróxido, carbonato o bicarbonato metálico, o con amoniaco o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Los cationes de sales terapéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, así como cationes de amina cuaternaria no tóxicos tales como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, diciclohexilamina, procaína, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina, 1-efenamina y N,N'-dibenciletilendiamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.

El término "solvatos" se usa en su sentido más amplio. Por ejemplo, el término solvatos incluye hidratos formados cuando un compuesto de la presente invención contiene una o más moléculas de agua unidas.

35 Los términos "alquilcarbonilo" y "alcanoilo", tal como se usan en el presente documento, se refieren a un grupo alquilo unido al resto molecular original a través de un grupo carbonilo. Los ejemplos de tales grupos incluyen metilcarbonilo, también conocido como acetilo; etilcarbonilo, también conocido como propionilo; y 2-metil-ciclopentilcarbonilo, etc.

40 El término "acilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un carbonilo unido a un alquilo, alquenilo, arilo, heteroarilo, heterocicloalquilo o cualquier otro resto en el que el átomo unido al carbonilo es carbono. Un grupo "acetilo" se refiere a un grupo -C(O)CH₃. Los ejemplos de grupos acilo incluyen grupos alcanoilo tales como formilo, acetilo y propionilo, grupos aroilo tales como benzoilo y grupos alquilarilo mixtos tales como cinamoilo.

45 El término "acilamino" se refiere a un radical amino sustituido con un grupo acilo. Un ejemplo de un radical "acilamino" es acetilamino (CH₃C(O)NH-); otro es benzoilamino.

50 El término "alquenilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de hidrocarburo insaturado de cadena lineal, de cadena ramificada o cíclico, o a un radical que contiene cualquier combinación de restos de cadena lineal o de cadena ramificada y cílicos que tiene uno o más dobles enlaces y que contiene desde 2 hasta 20 átomos de carbono o, en el caso de restos cílicos, que tiene desde 3 hasta 20 miembros de anillo. En muchas realizaciones, los grupos alquenilo comprenden desde 2 hasta 6 átomos de carbono. El término "grupos alquenilo" se usa en su sentido más amplio. Por ejemplo, el término "grupos alquenilo (C₂-C₈)" abarca radicales de hidrocarburo lineales, ramificados y cílicos que contienen de 2 a 8 átomos de carbono que tienen al menos un doble enlace. Los ejemplos de radicales alquenilo adecuados incluyen etenilo, también conocido como vinilo, propenilo, iso-propenilo, 55 butenilo, iso-butenilo, sec-butenilo, terc-butenilo, 1,3-butadienilo, n-pentenilo, n-hexenilo, radicales cicloalquenilo tales como ciclohexenilo y 1,3-ciclopentadienilo, radicales cicloalquenilalquilo tales como ciclohexenilmetilo, radicales alquenilcicloalquilo tales como metilenciclohexilo, y similares.

60 Alquenileno se refiere a un sistema de dobles enlaces carbono-carbono unido en dos o más posiciones, tal como etenileno [(-CH=CH-), (-C::C-)].

65 El término "alcoxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquil éter, en el que el término alquilo es tal como se define en el presente documento. Los ejemplos de radicales alquil éter adecuados incluyen metoxilo, etoxilo, n-propoxilo, iso-propoxilo, n-butoxilo, iso-butoxilo, sec-butoxilo, terc-butoxilo, ciclopentoxilo, y similares.

El término "alcoxialcoxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más grupos alcoxilo unidos al resto molecular original a través de otro grupo alcoxilo. Los ejemplos incluyen etoxietoxilo, metoxipropoxietoxilo, etoxipentoxietoxietoxilo, y similares.

- 5 El término "alcoxialquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alcoxilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquilo. El término "alcoxialquilo" también abarca grupos alcoxialquilo que tienen uno o más grupos alcoxilo unidos al grupo alquilo, es decir, para formar grupos monoalcoxialquilo y dialcoxialquilo.
- 10 El término "aloxicarbonilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alcoxilo unido al resto molecular original a través de un grupo carbonilo. Los ejemplos de tales grupos "aloxicarbonilo" incluyen metoxicarbonilo, etoxicarbonilo, propoxicarbonilo, butoxicarbonilo y hexiloxicarbonilo.
- 15 El término "aloxicarbonilalquilo" se refiere a radicales que tienen "aloxicarbonilo", tal como se definió anteriormente, sustituido en un radical alquilo. Los radicales aloxicarbonilalquilo más preferidos son "aloxicarbonilalquilo inferior" que tiene radicales aloxicarbonilo inferior, tal como se definió anteriormente, unidos a de uno a seis átomos de carbono. Los ejemplos de tales radicales aloxicarbonilalquilo inferior incluyen metoxicarbonilmetilo.
- 20 El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo de cadena lineal, ramificado o cíclico, o a un radical que consiste en cualquier combinación de radicales lineales, ramificados y/o cíclicos, que es un grupo de hidrocarburo alifático saturado que contiene desde 1 hasta 20 átomos de carbono. En muchas realizaciones, los grupos alquilo comprenden 1-10 átomos de carbono. En muchas otras realizaciones, los grupos alquilo comprenden 1-6 átomos de carbono. El término "grupos alquilo" se usa en su sentido más amplio. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos tal como se define en el presente documento. Los ejemplos de radicales alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, ciclopropilo, ciclopropilmetilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, ciclobutilo, pentilo, neopentilo, iso-amilo, hexilo, ciclohexilo, trans-1,2-di-etylclohexilo, octilo, nonilo, y similares. Por ejemplo, la abreviatura "grupos alquilo (C₁-C₆)" incluye grupos cicloalquilo (C₃-C₆) así como grupos alquilo lineales y ramificados, y "grupos O-alquilo (C₁-C₈)" incluye grupos O-alquilo (C₁-C₈) de cadena lineal, grupos O-alquilo (C₁-C₆) ramificados y grupos O-alquilo (C₁-C₆) cíclicos.
- 30 El término "alquileno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alifático saturado derivado de un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada unido en dos o más posiciones, tal como metileno (-CH₂), etileno y 1,3-ciclobutileno.
- 35 El término "alquilamino", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amino unido al resto molecular original a través de un grupo alquilo.
- 40 El término "alquilaminocarbonilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilamino unido al resto molecular original a través de un grupo carbonilo. Los ejemplos de tales radicales incluyen N-metilaminocarbonilo y N,N-dimetilcarbonilo.
- 45 El término "alquilideno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquenilo en el que un átomo de carbono del doble enlace carbono-carbono pertenece al resto al que se une el grupo alquenilo.
- 50 El término "alquilsulfinilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo unido al resto molecular original a través de un grupo sulfinilo. Los ejemplos de grupos alquilsulfinilo incluyen metilsulfinilo, etilsulfinilo, butilsulfinilo y hexilsulfinilo.
- 55 El término "alquilsulfonilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo unido al resto molecular original a través de un grupo sulfonilo. Los ejemplos de grupos alquilsulfonilo incluyen metanosulfonilo, etanosulfonilo, terc-butanosulfonilo, y similares.
- 60 El término "alquiltio", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquil tioéter (R-S-) en el que el término alquilo es tal como se definió anteriormente. Los ejemplos de radicales alquiltio adecuados incluyen metiltio, etiltio, n-propiltio, isopropiltio, n-butiltio, iso-butiltio, sec-butiltio, terc-butiltio, etoxietiltio, metoxipropoxietiltio, etoxipentoxietoxietiltio, y similares.
- 65 El término "alquiltioalquilo" abarca radicales alquiltio unidos a un radical alquilo. Los radicales alquiltioalquilo incluyen radicales "alquiltioalquilo inferior" que tienen radicales alquilo de uno a seis átomos de carbono y un radical alquiltio tal como se describió anteriormente. Los ejemplos de tales radicales incluyen metiltiometilo.
- 70 El término "alquinilo", tal como se usa en el presente documento en su sentido más amplio, se refiere a un radical de hidrocarburo insaturado de cadena lineal, de cadena ramificada o cíclico, así como a un radical que contiene cualquier combinación de radicales lineales, ramificados y/o cíclicos, que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono y que contiene desde 2 hasta 20 átomos de carbono. En muchas realizaciones, los grupos alquinilo contienen desde 2 hasta 6 átomos de carbono. En muchas otras realizaciones, los grupos alquinilo contienen desde 2 hasta 4 átomos de

carbono. "Alquinileno" se refiere a un triple enlace carbono-carbono unido en dos posiciones, tal como etinileno (-C:::C-, -C≡C-). Por ejemplo, los grupos alquinilo (C₂-C₈) abarcan cadenas de hidrocarburo lineales, ramificadas y cílicas que contienen de 2 a 8 átomos de carbono que tienen al menos un triple enlace, y el término incluye, pero no se limita a, sustituyentes tales como etinilo, propinilo, hidroxipropinilo, butin-1-ilo, butin-2-ilo, pentin-1-ilo, pentin-2-ilo, 4-metoxipentin-2-ilo, 3-metilbutin-1-ilo, hexin-1-ilo, hexin-2-ilo, hexin-3-ilo, 3,3-dimetilbutin-1-ilo, y similares, a menos que se indique lo contrario.

El término "amido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amino, tal como se describe a continuación, unido al resto molecular original a través de un grupo carbonilo o sulfonilo. El término "C-amido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo -C(=O)-NR₂, con R tal como se define en el presente documento. El término "N-amido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo RC(=O)NH-, con R tal como se define en el presente documento.

El término "amino", tal como se usa en el presente documento, se refiere a -NRR', en el que R y R' se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquenilo, alcoxilo, alcoxialquilo, aloxicarbonilo, alquilo, alquilcarbonilo, arilo, arilalquenilo, arilalquilo, cicloalquilo, haloalquilcarbonilo, heteroarilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquilo, heterociclo, heterocicloalquenilo y heterocicloalquilo, en el que el arilo, la parte de arilo del arilalquenilo, el arilalquilo, el heteroarilo, la parte de heteroarilo del heteroarilalquenilo y del heteroarilalquilo, el heterociclo y la parte de heterociclo del heterocicloalquenilo y del heterocicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes independientemente seleccionados del grupo que consiste en alquenilo, alcoxilo, alcoxialquilo, alquilo, ciano, halo, haloalcoxilo, haloalquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, nitrógeno y oxo.

El término "aminoalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo amino unido al resto molecular original a través de un grupo alquilo. Los ejemplos incluyen aminometilo, aminoetilo y aminobutilo. El término "alquilamino" indica grupos amino que se han sustituido con uno o dos radicales alquilo. Los grupos "alquilamino" adecuados pueden estar monoalquilados o dialquilados, formando grupos tales como, por ejemplo, N-metilamino, N-ethylamino, N,N-dimetilamino, N,N-diethylamino, y similares.

Los términos "aminocarbonilo" y "carbamolio", tal como se usan en el presente documento, se refieren a un grupo carbonilo sustituido con amino, en el que el grupo amino puede ser un grupo amino primario o secundario que contiene sustituyentes seleccionados de radicales alquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, y similares.

El término "aminocarbonilalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical aminocarbonilo unido a un radical alquilo, tal como se describió anteriormente. Un ejemplo de tales radicales es aminocarbonilmetilo. El término "amidino" indica un radical -C(NH)NH₂. El término "cianoamidino" indica un radical -C(N-CN)NH₂.

El término "aralquenilo" o "arilalquenilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquenilo.

El término "aralcoxilo" o "arilalcoxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un grupo alcoxilo.

El término "aralquilo" o "arilalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquilo.

El término "aralquilamino" o "arilalquilamino", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilalquilo unido al resto molecular original a través de un átomo de nitrógeno, en el que el átomo de nitrógeno está sustituido con hidrógeno.

El término "aralquilideno" o "arilalquilideno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquilideno.

El término "aralquiltio" o "arilalquiltio", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilalquilo unido al resto molecular original a través de un átomo de azufre.

El término "aralquinilo" o "arilalquinilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquinilo.

El término "aralcoxicarbonilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de la fórmula aralquil-O-C(O)-, en el que el término "aralquilo" tiene el significado proporcionado anteriormente. Ejemplos de un radical aralcoxicarbonilo son benciloxicarbonilo ("Z" o "Cbz") y 4-metoxifenilmoxicarbonilo ("MOS").

El término "aralcanoilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical acilo derivado de un ácido alcanoacarboxílico sustituido con arilo tal como benzoilo, fenilacetilo, 3-fenilpropionilo (hidrocinamilo), 4-fenilbutirilo, (2-naftil)acetilo, 4-clorohidrocinamilo, 4-aminohidrocinamilo, 4-metoxihidrocinamilo, y similares. El término "aroilo" se refiere a un radical acilo derivado de un ácido arilcarboxílico, teniendo el "arilo" el significado proporcionado a

continuación. Los ejemplos de tales aroilo radicales incluyen benzoilo o naftoilo sustituido y no sustituido tal como benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-carboxibenzoilo, 4-(benciloxicarbonil)benzoilo, 1-naftoilo, 2-naftoilo, 6-carboxi-2-naftoilo, 6-(benciloxicarbonil)-2-naftoilo, 3-benciloxi-2-naftoilo, 3-hidroxi-2-naftoilo, 3-(benciloxiformamido)-2-naftoilo, y similares.

5 El término "arilo", tal como se usa en el presente documento, significa un sistema aromático carbocíclico que contiene uno, dos o tres anillos, en el que tales anillos pueden estar unidos entre sí de manera colgante o pueden estar condensados. El término "arilo" abarca radicales aromáticos tales como fenilo, naftilo, antracenilo, fenantrilo y bifenilo. Los grupos arilo de la presente invención pueden estar opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente de los grupos tal como se definen en el presente documento.

10 El término "arilamino", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un grupo amino, tal como N-fenilamino, y similares.

15 Los términos "arilcarbonilo" y "aroilo", tal como se usan en el presente documento, se refieren a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un grupo carbonilo.

20 El término "ariloxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un átomo de oxígeno.

25 El término "arilsulfonilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un grupo sulfonilo.

30 El término "ariltio", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo arilo unido al resto molecular original a través de un átomo de azufre.

35 Los términos "carboxi" o "carboxilo", ya se usen solos o con otros términos, tales como "carboxialquilo", indican $-\text{CO}_2\text{H}$.

40 Los términos "benzo" y "benc", tal como se usan en el presente documento, se refieren al radical divalente $\text{C}_6\text{H}_4=$ derivado del benceno. Los ejemplos incluyen benzotifeno y bencimidazol.

45 El término "carbamoiloxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo carbonilo sustituido con amino unido al resto molecular original a través de un átomo de oxígeno (por ejemplo, $\text{RR}'\text{NC}(=\text{O})\text{O}-$), en el que el grupo amino puede ser un grupo amino primario o secundario que contiene sustituyentes seleccionados de radicales alquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, y similares.

50 El término "O-carbamilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}$, con R tal como se define en el presente documento.

55 El término "unido por C", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustituyente que está unido al resto molecular original a través de un enlace carbono-carbono.

60 El término "N-carbamilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo $\text{ROC}(\text{O})\text{NH}-$, con R tal como se define en el presente documento.

65 El término "carbonato", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$, con R tal como se define en el presente documento.

70 El término "carbonilo", tal como se usa en el presente documento, cuando aparece solo, incluye formilo $[-\text{C}(\text{O})\text{H}]$, y en combinación, es un grupo $-\text{C}(\text{O})-$.

75 El término "carboxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ o al "carboxilato" correspondiente, tal como un derivado de éster o derivado de sal de ácido carboxílico. Un grupo "O-carboxilo" se refiere a un grupo $\text{RC}(\text{O})\text{O}-$, en el que R es tal como se define en el presente documento. Un grupo "C-carboxilo" se refiere a un grupo $-\text{C}(\text{O})\text{OR}$, en el que R es tal como se define en el presente documento.

80 El término "ciano", tal como se usa en el presente documento, se refiere al grupo $-\text{CN}$.

85 El término "cicloalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo monocíclico, bicíclico o tricíclico, saturado o parcialmente saturado, en el que cada resto cíclico contiene desde 3 hasta 12, preferiblemente de tres a siete, miembros de anillo de átomos de carbono y que opcionalmente puede ser un sistema de anillos condesados con benzo que está opcionalmente sustituido tal como se define en el presente documento. Los ejemplos de tales radicales cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, octahidronaftilo, 2,3-dihidro-1H-indenilo, adamantilo, y similares. Se pretende que "bicíclico" y "tricíclico", tal como se usan en el presente documento, incluyan tanto sistemas de anillos condensados, tales como decahidronaftaleno, octahidronaftaleno, como el tipo saturado o parcialmente saturado multicíclico (de múltiples centros). Este último tipo

de isómero se ejemplifica, en general, por biciclo[2.2.2]octano, biciclo[2.2.2]octano, biciclo[1.1.1]pentano, alcanfor y biciclo[3.2.1]octano.

5 El término "cicloalquenilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical monocíclico, bicíclico o tricíclico parcialmente insaturado en el que cada resto cíclico contiene desde 3 hasta 12, preferiblemente de cinco a ocho, miembros de anillo de átomos de carbono y que opcionalmente puede ser un sistema de anillos condensados con benzo que está opcionalmente sustituido tal como se define en el presente documento. Los ejemplos de tales radicales cicloalquenilo incluyen ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptenilo, ciclooctadienilo, 1H-indenilo, y similares.

10 10 El término "cicloalquilalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo, tal como se definió anteriormente, que está sustituido con un radical cicloalquilo, tal como se definió anteriormente. Los ejemplos de tales radicales cicloalquilalquilo incluyen ciclopripilmetilo, ciclobutilmetilo, ciclopentilmetilo, ciclohexilmetilo, 1-ciclopentiletilo, 1-ciclohexiletilo, 2-ciclopentiletilo, 2-ciclohexiletilo, ciclobutilpropilo, ciclopentilpropilo, ciclohexilbutilo, y similares.

15 20 El término "cicloalquenilalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo, tal como se definió anteriormente, que está sustituido con un radical cicloalquenilo, tal como se definió anteriormente. Los ejemplos de tales radicales cicloalquenilalquilo incluyen 1-metilciclohex-1-enilo, 4-etyl ciclohex-1-enilo, 1-butilciclopent-1-enilo, 3-metilciclopent-1-enilo, y similares.

25 25 El término "éster", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo carboniloxilo, -(C=O)O-, que forma un puente con dos restos unidos en átomos de carbono. Los ejemplos incluyen benzoato de etilo, cinamato de n-butilo, acetato de fenilo, y similares.

30 30 El término "éter", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo oxilo que forma un puente con dos restos unidos en átomos de carbono.

35 35 El término "halo" o "halógeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

40 40 El término "haloalcoxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo haloalquilo unido al resto molecular original a través de un átomo de oxígeno.

45 45 El término "haloalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo que tiene el significado tal como se definió anteriormente en el que uno o más hidrógenos se reemplazan por un halógeno. Se incluyen específicamente radicales monohaloalquilo, dihaloalquilo, perhaloalquilo y polihaloalquilo. Un radical monohaloalquilo, para un ejemplo, puede tener un átomo de yodo, bromo, cloro o fluoro dentro del radical. Los radicales dihaloalquilo y polihaloalquilo pueden tener dos o más de los mismos átomos de halógeno o una combinación de diferentes radicales halo. Los ejemplos de radicales haloalquilo incluyen fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, tricloroetilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo, difluoroclorometilo, diclorofluorometilo, difluoroetilo, difluoropropilo, dicloroetilo y dicloropropilo. "Haloalquíleno" se refiere a un grupo halohidrocarbilo unido en dos o más posiciones. Los ejemplos incluyen fluorometileno (-CHF₂), difluorometileno (-CF₂), clorometileno (-CHCl₂), y similares. Los ejemplos de tales radicales haloalquilo incluyen clorometilo, 1-bromoetilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, 1,1,1-trifluoroetilo, perfluorodecilo, y similares.

50 50 El término "heteroalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical de hidrocarburo lineal o de cadena ramificada o cíclico estable, o combinaciones de los mismos, completamente saturado o que contiene desde 1 hasta 3 grados de insaturación, que consiste en el número indicado de átomos de carbono y desde uno hasta tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, y en el que los átomos de nitrógeno y azufre puede estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El/los heteroátomo(s) O, N y S puede(n) ubicarse en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tal como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃.

55 55 El término "heteroarilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo aromático de cinco o seis miembros, en el que al menos un átomo se selecciona del grupo que consiste en N, O y S, y el resto de átomos de anillo son carbono. Los anillos de cinco miembros tienen dos dobles enlaces y los anillos de seis miembros tienen tres dobles enlaces. Los grupos heteroarilo se conectan al grupo molecular original a través de un átomo de carbono o nitrógeno que puede sustituirse en el anillo. El término "heteroarilo" también incluye sistemas en los que un anillo de heteroarilo se condensa con un grupo arilo, tal como se define en el presente documento, un grupo heterociclo, tal como se define en el presente documento, o un grupo heteroarilo adicional. Los heteroarilos se ejemplifican por benzotienilo, benzoxazolilo, benzofuranilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo benzotriazolilo, cinolinilo, furilo, imidazolilo, triazolilo [por ejemplo, 4H-1,2,4-triazolilo, 1H-1,2,3-triazolilo, 2H-1,2,3-triazolilo, etc.], tetrazolilo [por ejemplo, 1H-tetrazolilo, 2H-tetrazolilo, etc.], indazolilo, indolilo, isoxazolilo, isoquinolinilo, isotiazolilo, naftiridinilo, oxadiazolilo [por ejemplo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, etc.], oxazolilo, isoxazolilo, purinilo, tiazolilo, isotiazolilo, tienopiridinilo, tienilo, tiadiazolilo [por ejemplo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, etc.], piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazolilo, pirrolilo, pirido[2,3-d]pirimidinilo, pirrolo[2,3-b]piridinilo,

quinazolinilo, quinolinilo, tienilo, tienol, benzotienilo, furilo, benzofurilo, dibenzofurilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, indolilo, quinolilo, isoquinolilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, oxazolilo, tiazolilo, triazolilo e isoxazolilo.

5 Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, tienilo, benzotienilo, furilo, benzofurilo, dibenzofurilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirazinilo, pirimidinilo, indolilo, quinolilo, isoquinolilo, quinoxalinilo, tetrazolilo, oxazolilo, tiazolilo, triazolilo e isoxazolilo.

10 El término "heteroarylalquilo" o "heteroarylalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquilo.

El término "heteroarylalquenilo" o "heteroarylalquenilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquenilo.

15 El término "heteroarylalcoxilo" o "heteroarylalcoxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo unido al resto molecular original a través de un grupo alcoxilo.

20 El término "heteroarylalquilideno" o "heteroarylalquilideno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquilideno.

25 El término "heteroarylloxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo unido al resto molecular original a través de un átomo de oxígeno.

El término "heteroarilsulfonilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heteroarilo unido al resto molecular original a través de un grupo sulfonilo.

30 Los términos "heterocicloalquilo" y, de manera intercambiable, "heterociclico", tal como se usan en el presente documento, se refieren, cada uno, a un radical heterocíclico monocíclico, bicíclico o tricíclico, saturado, parcialmente insaturado o completamente insaturado, que contiene uno o más heteroátomos como miembros de anillo, en el que

35 cada uno de dichos heteroátomos puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre, y en el que normalmente hay de 3 a 8 miembros de anillo en cada anillo. Los anillos heterocíclicos más habituales contienen de 5 a 6 miembros de anillo. En algunas realizaciones de esta invención, los anillos heterocíclicos contienen de 1 a 4 heteroátomos; en otras realizaciones, los anillos heterocíclicos contienen de 1 a 2 heteroátomos. Se pretende que "heterocicloalquilo" y "heterociclo" incluyan sulfonas, sulfóxidos, N-óxidos de

40 miembros de anillo de nitrógeno terciario y sistemas de anillos condensados carbocíclicos y condensados con benzo; además, ambos términos también incluyen sistemas en los que un anillo de heterociclo se condensa con un grupo arilo, tal como se define en el presente documento, o un grupo heterociclo adicional. Los grupos heterociclo de la

45 invención se ejemplifican por aziridinilo, azetidinilo, 1,3-benzodioxolilo, dihidroisoindolilo, dihidroisoquinolinilo, dihidrocinolinilo, dihidrobenzodioxinilo, dihidro[1,3]oxazolo[4,5-b]piridinilo, benzotiazolilo, dihidroindolilo,

50 dihidropiridinilo, 1,3-dioxanilo, 1,4-dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, isoindolinilo, morfolinilo, piperazinilo, pirrolidinilo, tetrahidropiridinilo, piperidinilo, tiomorfolinilo, y similares. Los grupos heterociclo pueden estar opcionalmente sustituidos, a menos que esté específicamente prohibido.

55 El término "heterocicloalquenilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterociclo unido al resto molecular original a través de un grupo alquenilo.

60 El término "heterocicloalcoxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterociclo unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno.

65 El término "heterocicloalquilalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un radical alquilo, tal como se definió anteriormente, en el que al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza por un radical heterocicloalquilo, tal como se definió anteriormente, tal como pirrolidinilmétido, tetrahidrotienilmétido, piridilmétido, y similares.

70 El término "heterocicloalquilideno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo heterociclo unido al resto molecular original a través de un grupo alquilideno.

75 El término "hidrazinilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a dos grupos amino unidos por un enlace sencillo, es decir, -N-N-.

80 Los términos "hidroxi" e "hidroxilo", tal como se usan en el presente documento, se refieren al grupo -OH.

85 El término "hidroxialquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno a aproximadamente diez átomos de carbono, uno de los cuales puede estar sustituido con uno o más radicales hidroxilo. Los ejemplos de tales radicales incluyen hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxipropilo, hidroxibutilo e hidroxihexilo.

- El término "hidroxialquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo hidroxilo unido al resto molecular original a través de un grupo alquilo.
- 5 El término "imino", tal como se usa en el presente documento, se refiere a =N-.
- El término "iminohidroxilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a =N(OH) y a =NO-.
- 10 La expresión "en la cadena principal" se refiere a la cadena adyacente o contigua más larga de átomos de carbono que comienza en el punto de unión de un grupo a los compuestos de esta invención.
- 10 El término "isocianato" se refiere a un grupo -NCO.
- El término "isotiocianato" se refiere a un grupo -NCS.
- 15 La expresión "cadena lineal de átomos" se refiere a la cadena lineal más larga de átomos seleccionados independientemente de carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.
- 20 El término "inferior", tal como se usa en el presente documento en términos tales como "alquilo inferior", significa que tiene 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono.
- 20 El término "mercaptoalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo R'SR-, en el que R y R' son tal como se definen en el presente documento.
- 25 El término "mercaptomeraptilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo RSR'S-, en el que R es tal como se define en el presente documento.
- El término "mercaptilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo RS-, en el que R es tal como se define en el presente documento.
- 30 El término "nulo" se refiere a un par de electrones solitario.
- El término "nitro", tal como se usa en el presente documento, se refiere a -NO₂.
- 35 El término "opcionalmente sustituido" significa que el grupo anterior puede estar sustituido o no sustituido. "Sustituido" significa que uno o más átomos de hidrógeno unidos a carbono se reemplazan por "sustituyentes". Los sustituyentes que se incluyen dentro de o se contemplan por el término "opcionalmente sustituido" son: alquilo C₁₋₃, cicloalquilo C₃₋₆, alcoxilo C₁₋₃, hidroxilo, alcanoílo C₁₋₃, alcoxicarbonilo C₁₋₃, halo, fenilo, bencilo, fenoxilo, benzoílo, piridilo, amino, alquilamino C₁₋₃, amido, alquilamido C₁₋₃, ciano, haloalquilo C₁₋₃ y perhaloalquilo C₁₋₃. Dos sustituyentes pueden unirse entre sí para formar un anillo carbocíclico o heterocíclico condensado de cuatro, cinco, seis o siete miembros que consiste en de cero a tres heteroátomos, tales como metilendioxilo o etilendioxilo. Un grupo opcionalmente sustituido puede no estar sustituido (por ejemplo, -CH₂CH₃), completamente sustituido (por ejemplo, -CF₂CF₃), monosustituido (por ejemplo, -CH₂CH₂F) o sustituido en un nivel cualquiera entre completamente sustituido y monosustituido (por ejemplo, -CH₂CF₃). Cuando se enumeran sustituyentes sin calificación en cuanto a la sustitución, se abarcan formas tanto sustituidas como no sustituidas. Cuando se califica un sustituyente como "sustituido", se pretende específicamente la forma sustituida. Todos los restos arilo, heteroarilo y heterociclo colgantes pueden estar opcionalmente sustituidos adicionalmente con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituyentes seleccionados independientemente de los grupos enumerados anteriormente.
- 40 Los términos "oxi" u "oxa", tal como se usan en el presente documento, se refieren a -O-.
- 50 50 El término "oxo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un oxígeno unido por un doble enlace =O.
- 55 El término "perhaloalcoxilo" se refiere a un grupo alcoxilo en el que todos los átomos de hidrógeno se reemplazan por átomos de halógeno.
- 55 El término "perhaloalquilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo en el que todos los átomos de hidrógeno se reemplazan por átomos de halógeno.
- 60 El término "fosfonato", tal como se usa en el presente documento, se refiere al grupo -P(=O)(OG)(OG1), en el que G y G1 se eligen de H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, etc.
- 65 El término "fosfinato", tal como se usa en el presente documento, se refiere al grupo -P(=O)(G)(OG1), en el que G y G1 se eligen de H, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo, etc.
- 65 Los términos "sulfonato", "ácido sulfónico" y "sulfónico", tal como se usan en el presente documento, se refieren al grupo -SO₃H y a su anión cuando se usa ácido sulfónico en la formación de sales.

El término "sulfanilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a -S y -S-.

El término "sulfinilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a -S(O)-.

5 El término "sulfonilo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a -SO₂-.

El término "N-sulfonamido" se refiere a un grupo RS(=O)₂NH-, con R tal como se define en el presente documento.

10 El término "S-sulfonamido" se refiere a un grupo -S(=O)₂NR₂, con R tal como se define en el presente documento.

Los términos "tia" y "tio", tal como se usan en el presente documento, se refieren a un grupo -S- o a un éter en el que el oxígeno se reemplaza por azufre. Los derivados oxidados del grupo tio, concretamente sulfinilo y sulfonilo, se incluyen en la definición de tia y tio.

15 15 El término "tioéter", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo tio que forma un puente con dos restos unidos en átomos de carbono.

El término "tiol", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo -SH.

20 20 Tal como se usa en el presente documento, el término "tiocarbonilo" incluye, cuando aparece solo, tioformilo -C(S)H, y en combinación, es un grupo -C(S)-.

El término "N-tiocarbamilo" se refiere a un grupo ROC(S)NH-, con R tal como se define en el presente documento.

25 25 El término "O-tiocarbamilo" se refiere a un grupo -OC(S)NR, con R tal como se define en el presente documento.

El término "tiocianato" se refiere a un grupo -CNS.

30 30 El término "trihalometanosulfonamido" se refiere a un grupo X₃CS(O)₂NR, siendo X un halógeno y con R tal como se define en el presente documento.

El término "trihalometanosulfonilo" se refiere a un grupo X₃CS(O)₂-, en el que X es un halógeno.

35 35 El término "trihalometoxilo" se refiere a un grupo X₃CO-, en el que X es un halógeno.

El término "sililo trisustituido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo silicona sustituido en sus tres valencias libres con grupos tal como se enumeran en el presente documento bajo la definición de amino sustituido. Los ejemplos incluyen trimetilsililo, terc-butildimetilsililo, trifenilsililo, y similares.

40 40 El término "urea", tal como se usa en el presente documento, se refiere a -N(R)C(=O)N(R)(R), con R tal como se define en el presente documento.

45 El término "portador" se usa en su sentido más amplio. Por ejemplo, el término portador se refiere a cualquier portador, diluyente, excipiente, agente humectante, agente de tamponamiento, agente de suspensión, agente lubricante, adyuvante, vehículo, sistema de administración, emulsionante, dispersante, absorbente, conservante, tensioactivo, colorante, aromatizante y edulcorante. En algunas realizaciones, el portador puede ser un portador farmacéuticamente aceptable, un término más estricto que portador, porque el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa un portador no tóxico que sería adecuado para su uso en una composición farmacéutica.

50 50 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, en un portador farmacéuticamente aceptable, una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la invención para su uso en un método de la invención.

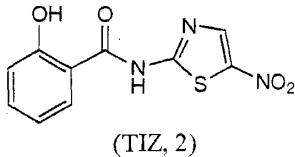
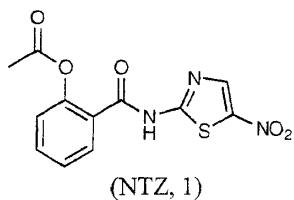
55 55 El término cantidad eficaz se usa en su sentido más amplio. Por ejemplo, el término se refiere a la cantidad necesaria para producir un efecto deseado.

Descripción detallada

60 60 En una realización, la presente invención se dirige a la maduración de la hemaglutinina viral y ofrece la oportunidad de interrumpir la producción de partículas virales infecciosas en una etapa diferente de la que proporcionan los fármacos antígrípales disponibles en la actualidad. En otra realización, la invención proporciona o contempla productos para su uso en un método de tratamiento y prevención de infección viral en seres humanos y otros mamíferos mediante la administración de cantidades eficaces de compuestos de fórmula I tal como se define en las reivindicaciones. Uno de tales compuestos es nitazoxanida (1), un producto autorizado en los Estados Unidos para el tratamiento de gastroenteritis infecciosa que actualmente se encuentra en ensayos clínicos de fase II en los Estados Unidos y en el

extranjero para el tratamiento de hepatitis C crónica. Se ha demostrado que el fármaco es seguro y eficaz incluso cuando se administra durante un año, y podrían iniciarse estudios clínicos de fase II para el tratamiento de la gripe en cualquier momento en el futuro. Los ensayos clínicos han demostrado recientemente la actividad de formulaciones farmacéuticas de nitazoxanida comercialmente disponibles para el tratamiento de gastroenteritis por rotavirus y hepatitis B y C crónicas.

5



Procedimientos experimentales

10

Materiales y métodos

Materiales

15 Se disolvieron nitazoxanida (NTZ, 1), tizoxanida (TIZ, 2) y análogos de tiazolidina y el compuesto de referencia swainsonina (SW) (Sigma-Aldrich) en dimetilsulfóxido (DMSO). Se disolvieron tunicamicina (TM) y 1-desoximanojirimicina (DMJ) (Sigma-Aldrich) en disolución acuosa.

20

Métodos para los estudios de la gripe

25 Cultivo celular, tratamiento y transfección: se hicieron crecer células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células epiteliales de tipo II alveolares A549 humanas, linfoblastoideas T Jurkat y de leucemia monocítica U397 a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ en RPMI 1640 (Invitrogen), complementado con suero bovino fetal al 10% (FCS), glutamina 2 mM y antibióticos. Se añadieron los compuestos sometidos a prueba inmediatamente después de un periodo de adsorción de 1 hora y se mantuvieron en el medio de cultivo durante la totalidad del experimento, a menos que se especifique de manera diferente. Los controles recibieron cantidades iguales de vehículo, que no afectó ni a la viabilidad celular ni a la replicación del virus. Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de conversión de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en formazano de MTT (Sigma-Aldrich) tal como se describió previamente. Se realizó el examen microscópico de células infectadas de manera simulada o infectadas con virus usando un microscopio DM-IL de Leica y se capturaron las imágenes en una cámara DC-300 de Leica usando el software Image-Manager500 de Leica.

30 Para los experimentos de transfección, se transfecieron de manera transitoria células MDCK sembradas en cámaras de cubreobjetos LabTekII (Nunc-Thermo Fisher Scientific Inc.) con mutante de receptor de lipoproteínas de baja densidad humano (hLDLR) con internalización defectuosa etiquetado con proteína verde fluorescente (GFP) (plásmido LDLR-A18-GFP, amablemente proporcionado por E. Rodriguez-Boulan, Universidad Cornell de Nueva York, NY), usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

35 Preparación del virus, infección y titulación: para este estudio se utilizaron cuatro virus de la gripe A diferentes, el H1N1 de mamífero A/PR/8/34 (PR8) y A/WSN/33 (WSN), y el H3N2 A/Firenze/7/03 (A/FI), y el H5N9 cepa aviar de baja patogenia A/Ck/It/9097/97 (A/Ck), así como el aislado clínico de B/Parma/3/04 del virus de la gripe B. Los virus de la gripe A/Firenze/7/03, A/Ck/It/9097/97 y B/Parma/3/04 los proporcionó amablemente por la Dra. Isabella Donatelli, Instituto Superior de Sanidad, Roma, Italia. La cepa aviar A/Ck/It/9097/97 se aisló después de un pase inicial de homogeneizados de órganos de gallina en huevos de gallina embrionados de 10 días libres de patógenos específicos (SPF). Se hicieron crecer los virus de la gripe A en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 8 días. Después de 48 h a 37°C, se recogió el líquido alantoideo y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min para retirar el residuo celular, y se determinaron los títulos de virus mediante titulación de hemaglutinina y ensayo de placas, según procedimientos convencionales. Se infectaron monocapas de células confluentes con virus de la gripe durante 1 h a 37°C a una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 5 HAU/10⁵ células, a menos que se especifique de manera diferente. 40

45 Después del periodo de adsorción (tiempo 0), se retiró el inóculo viral y se lavaron las monocapas de células tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se mantuvieron las células a 37°C en medio de cultivo RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 2%. Para las curvas de crecimiento de virus de múltiples etapas, se incubaron células infectadas en el mismo medio que contenía tripsina IX 1 µg/ml (Sigma-Aldrich). Se determinó la producción de viriones 24 ó 48 h posterior a la infección (p.i.) mediante titulación de hemaglutinina. Para el ensayo de infectividad del virus PR8, se inocularon células MDCK cultivadas en placas de 96 pocillos con diluciones en serie de suspensión viral en presencia de tripsina 1 µg/ml durante 48 h a 37°C, y se determinó la TCID₅₀ (dosis infectante del 50% del histocultivo) tal como se describe. Alternativamente, se determinaron los títulos de virus en células MDCK contando los números de células fluorescentes después de la infección y tinción de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos antigripales A/PR/8/34 (anticuerpos anti-PR8 proporcionados amablemente por E. Rodriguez-Boulan, Universidad Cornell de Nueva York, NY). Los títulos se expresaron de manera correspondiente como uff (unidades 50

55 55

60 60

formadoras de fluorescencia)/ml.

5 Marcaje metabólico, análisis de la síntesis de proteínas e inmunotransferencia de tipo Western: se marcaron células infectadas de manera simulada o infectadas con el virus de la gripe con 10 μ Ci/ml de [35 S]-metionina-cisteína ([35 S]-Met/Cys, mezcla de marcaje celular *in vitro* Redivue Pro-Mix 35S; GE Healthcare) durante los tiempos indicados después de 30 min de privación en medio libre de metionina/cisteína. Para los experimentos de pulso/caza, se marcaron las células con [35 S]-Met/Cys (100 μ Ci/ml) durante 15 min, después de 30 min de privación en medio libre de metionina/cisteína. Al final del pulso, se cazaron las células en medio completo que contenía metionina fría 10 mM y cicloheximida 1 mM durante diferentes tiempos en ausencia o presencia de TIZ. Se terminaron el pulso/la caza colocando las células en hielo. Después de la lisis celular en tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 1%, KCl 600 mM), que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y un cóctel inhibidor de proteasas (PIC; Roche Diagnostics GmbH), se separaron muestras que contenían la misma cantidad de radiactividad mediante SDS/PAGE (gel de apilamiento al 3%, gel de resolución al 10%) y se procesaron para autorradiografía, tal como se describe. Se visualizaron y cuantificaron los patrones autorradiográficos en el dispositivo de obtención de imágenes Typhoon-8600 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) y se adquirieron las imágenes usando el software ImageQuant (Amersham Pharmacia Biotech) (análisis de MDP).

10 15 Para el análisis de proteínas incorporadas en las partículas virales, se marcaron células MDCK infectadas con PR8 o infectadas de manera simulada tratadas con TIZ, TM o vehículo después de la adsorción del virus a las 3 h p.i. con [35 S]-Met/Cys (25 μ Ci/ml, pulso de 21 h) en presencia de los fármacos. A las 24 h p.i., se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se sometieron a centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min para retirar el residuo celular y luego a ultracentrifugación a 45.000 rpm (ultracentrífuga Beckman XL-100K, rotor 70.1Ti; Beckman Coulter Inc.) durante 2 horas. Se resuspendieron los sedimentos que contenían partículas virales en tampón de muestra Laemmli y se separaron las proteínas virales radiomarcadas mediante SDS-PAGE al 10% y se examinaron mediante autorradiografía, después de la exposición a reactivo fluorográfico Amplify™ (GE Healthcare). Se visualizaron los patrones autoradiográficos tal como se describió anteriormente.

20 25 Para el análisis por inmunotransferencia de tipo Western, se sometieron a lisis las células con tampón de extracción de alto contenido en sales (HSB) frío que contenía ditiotreitol (DTT) 2 mM, PMSF 1 mM, ortovanadato 1 mM, β -glicerofosfato 20 mM, fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) 1 mM y PIC, o con tampón RIPA que contenía PMSF 1 mM y PIC. Se separaron los extractos de células completas (30 μ g) mediante SDS-PAGE, se inmunotransfirieron a nitrocelulosa y se incubaron los filtros con anticuerpos policlonales anti-fosfoSer51-eIF2 α (p-eIF2 α , Calbiochem), anti-eIF2 α (FL-315, Santa Cruz Biotechnology) y antigripal A/PR/8/34 o anticuerpos monoclonales anti-HA (IVC102; Biodesign Inc.) y anti-Grp78/BiP (Stressgene), seguido de la decoración con anticuerpo anti-IgG de conejo o anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (kit de detección Super Signal; Pierce). Se determinó la evaluación cuantitativa de proteínas mediante análisis Versadoc-1000 usando el programa de software Quantity One, disponible de BIO-RAD Laboratories.

30 35 40 45 50 Inmunoprecipitación de HA0: se marcaron células MDCK infectadas con PR8 o infectadas de manera simulada tratadas con TIZ 10 μ g/ml o diluyente de control después de la adsorción del virus a las 5 ó 6 h p.i. con [35 S]-Met/Cys (70 μ Ci/ml, pulso de 4 h) después de 30 min de privación en medio libre de metionina/cisteína. Después de la lisis en tampón RIPA en presencia de PIC y PMSF 1 mM, se retiró el sedimento celular mediante centrifugación en frío a 13.000 rpm durante 10 min. Se incubaron los lisados radiomarcados (50 μ l) con anticuerpos monoclonales anti-HA (IVC102; Biodesign Inc.) en tampón RIPA que contenía PMSF 1 mM, PIC y proteína-A-Sepharose (Sigma-Aldrich) a 4°C durante 16 h. Después de la centrifugación, se lavaron los sedimentos 3 veces con tampón RIPA y se eluyeron en tampón de muestra Laemmli (20) a 95°C durante 5 min. Se sometieron las muestras inmunoprecipitadas a digestión con Endo-H (tal como se describe a continuación) y/o se procesaron para SDS/PAGE (gel de apilamiento al 3%, gel de resolución al 10%) y autorradiografía, después de la exposición a reactivo fluorográfico Amplify™. Se visualizaron los patrones autoradiográficos en el dispositivo de obtención de imágenes Typhoon-8600 y se adquirieron las imágenes tal como se describió anteriormente.

55 60 65 Análisis de glicosilación, trimerización y procesamiento de hemaglutinina: se marcaron células infectadas de manera simulada o infectadas con el virus de la gripe con 20 μ Ci/ml de clorhidrato de [3 H]-manosa o [3 H]-glucosamina (GE Healthcare) durante 4 horas a las 6 h p.i., y luego se procesaron para SDS/PAGE (gel de apilamiento al 3%, gel de resolución al 10%) y autorradiografía, tal como se describió anteriormente. Para los experimentos de digestión con endoglicosidasa, se infectaron células MDCK con virus de la gripe PR8, se lavaron para eliminar el virus no unido y se incubaron en presencia o ausencia de TIZ 10 μ g/ml. A las 5 h p.i., se marcaron las células con [35 S]-Met/Cys (50 μ Ci/ml, pulso de 4 h) después de 30 min de privación en medio libre de metionina/cisteína. Al final del pulso, se retiró el medio radiactivo y se colocaron las células en hielo. Después de la lisis en tampón L (NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%) en presencia de PIC y PMSF 1 mM y de la centrifugación en frío a 13.000 rpm durante 10 min, se procesaron las muestras que contenían la misma cantidad de radiactividad para la digestión con endoglicosidasa H (Endo-H) o péptido N-glicosidasa F (PNGasa-F). Para la digestión con Endo-H, se incubaron las muestras inmunoprecipitadas con anticuerpo monoclonal anti-HA (tal como se describió anteriormente) o las muestras no inmunoprecipitadas en 100 μ l de SDS al 0,1% y β -mercaptoetanol 140 mM en citrato de sodio 100 mM (pH 5,5), y se calentaron durante 5 min a 95°C. Después de la adición de PMSF 1 mM y PIC, se dividieron las

muestras en dos alícuotas iguales, y se incubó una alícuota con 5 mU de Endo-H (Roche Diagnostics GmbH) durante 16 h a 37°C. Se realizó la digestión con péptido N-glicosidasa con 500 U de PNGasa-F, según el protocolo del fabricante (New England BioLabs Inc.). Se terminaron las digestiones con la adición de tampón de muestra Laemmli. Se calentaron las muestras a 95°C durante 5 min antes de su carga sobre geles SDS-PAGE al 10%. Para el análisis de formaciones de trímeros, se realizó reticulación de HA mediante la adición de un volumen 1:10 de DMSO que contenía EGS [bis(succinimidysuccinato) de etilenglicol; Pierce] 0,2 mM a los extractos de células completas de las células MDCK infectadas de manera simulada e infectadas con PR8. Después de 15 min a 22°C, se extinguieron las reacciones mediante la adición de glicina a una concentración final de 75 mM y se sometieron las muestras a SDS-PAGE (gel de resolución al 6%). Se visualizaron los productos reticulados con HA mediante análisis con sonda de anticuerpos monoclonales anti-HA o policlonales anti-PR8.

Microscopía de inmunofluorescencia: se fijaron células MDCK infectadas con PR8 y células A549 infectadas con WSN hechas crecer sobre cubreobjetos con paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada con fosfato durante 20 min a temperatura ambiente a las 16 ó 24 h p.i., respectivamente. Se procesaron las células infectadas de manera simulada de manera similar. Las células fijadas o bien se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-HA (IVC102; Biodesign Inc.) durante 1 h a 37°C para la tinción de la membrana plasmática o bien se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente y luego se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-HA y anti-p230 trans-Golgi (clon 15; BD Biosciences) o policlonales anti- α -tubulina (11H10; Cell Signaling, Technology Inc.) durante 1 h a 37°C, seguido por la decoración con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor488 (Molecular Probes-Invitrogen) o conjugado con rodamina (Pierce) y anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con rodamina (Pierce). Se tiñeron los núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o Hoechst 33342 (Molecular Probes, Invitrogen). Se capturaron las imágenes y se deconvolucionaron con un microscopio DeltaVision (Applied-Precision) usando el software SoftWoRx-2.50 (Applied-Precision). Las incubaciones de control demostraron que no había reactividad cruzada entre los conjugados anti-inmunoglobulina o entre el conjugado anti-inmunoglobulina y el anticuerpo primario irrelevante. Se muestran imágenes a partir de un experimento representativo de tres con resultados similares.

Para la detección del direccionamiento a la membrana plasmática del receptor de lipoproteínas de baja densidad humano (hLDLR), se transfecaron de manera transitoria células MDCK sembradas en cámaras de cubreobjetos con mutante de hLDLR con internalización defectuosa etiquetado con GFP (plásmido LDLR-A18-GFP) y, después de 8 h, se trataron con TIZ (10 μ g/ml) o vehículo durante las siguientes 16 h. Después de bloquear la síntesis de proteínas con cicloheximida 100 μ g/ml (Sigma-Aldrich) durante 1 h, se tiñeron las membranas plasmáticas usando tinte de membrana plasmática CellMask™ Orange (Molecular Probes, Invitrogen). Después de la tinción, se examinaron las células usando un microscopio de fluorescencia DM-IL de Leica equipado con filtros de excitación UV. Se capturaron las imágenes con una cámara DC-300 de Leica usando el software Image-Manager500 de Leica.

Ensayo de hemadsorción: se trataron monocapas de células MDCK infectadas de manera simulada o infectadas con PR8 con TIZ, TM o vehículo después de la adsorción del virus. A las 5 h p.i., se lavaron las células tres veces con PBS y se incubaron con el 0,1% de glóbulos rojos (RBC) humanos en PBS durante 20 min a 4°C para inhibir la actividad neuraminidasa. Después de la retirada de los eritrocitos no unidos lavando tres veces con PBS, se detectaron los RBC adsorbidos sobre la superficie de las células MDCK mediante microscopía de contraste de fases. Se capturaron las imágenes con un microscopio DMLB de Leica equipado con una cámara DC-300 de Leica, usando el software Image-Manager500 de Leica. Se sometieron a lisis los eritrocitos adherentes en tampón NH₄Cl 150 mM durante 2 h a temperatura ambiente y se cuantificaron midiendo la absorbancia de hemoglobina a $\lambda=540$ nm.

Análisis estadístico: se realizó el análisis estadístico usando la prueba de la t de Student para datos independientes. Los datos se expresan como media \pm D.E. de muestras duplicadas. Los valores de P < 0,05 se consideraron significativos.

50 RESULTADOS

Actividad antiviral de tiazolidas contra diferentes cepas del virus de la gripe A. Se investigó el efecto del tratamiento con tiazolidas en células humanas y caninas después de la infección con cuatro cepas del virus de la gripe A diferentes: los virus H1N1 de mamífero A/PR/8/34 (PR8) y A/WSN/33 (WSN), y el H3N2 A/Firenze/7/03 (A/FI), y el H5N9 cepa aviar de baja patogenia A/Ck/It/9097/97 (A/Ck). Se trataron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) infectadas con los virus de la gripe PR8, WSN o A/Ck con diferentes concentraciones de NTZ, TIZ o vehículo inmediatamente después del periodo de adsorción del virus, y se determinó la producción de viriones a las 24 h posterior a la infección (p.i.). El tratamiento con NTZ provocó una inhibición dependiente de la dosis de la replicación del virus con una CE₅₀ de 1, 0,5 y 1 μ g/ml para los virus PR8, WSN y A/Ck, respectivamente (figura 1B). TIZ fue igualmente activo contra todas las cepas de la gripe A con una CE₅₀ de 1 μ g/ml (PR8) y 0,5 μ g/ml (WSN y A/Ck) (figura 1B). TIZ también fue muy eficaz en la inhibición de la replicación de los virus de la gripe A H3N2 A/FI y de la gripe B B/Parma/3/04 (figuras 10 y 11). Ni NTZ ni TIZ fueron citotóxicos a la concentración antiviral eficaz para células no infectadas (CC₅₀ > 50 μ g/ml). Además de las células caninas MDCK usadas normalmente para estudios del virus de la gripe, TIZ fue eficaz en la inhibición de la replicación del virus de la gripe A a concentraciones no tóxicas submicromolares (CE₅₀ = 0,3 μ g/ml) en diferentes tipos de células humanas, incluyendo células monocíticas U937, linfocíticas T Jurkat y de tipo II

alveolares A549 (figura 1C). La actividad antigripal de TIZ era independiente de la m.o.i. de infección, y se detectó igualmente un bloqueo drástico de la replicación del virus H1N1 PR8 en condiciones de crecimiento del virus en múltiples etapas y en una sola etapa (figuras 10C, D). En la tabla 1 se resume la actividad antiviral de varias tiazolidas contra el virus de la gripe A PR8. Entre las tiazolidas sometidas a prueba, se halló que NTZ (1), TIZ (2), la sal sódica de tizoxanida (3), los compuestos 14-16, 27, 28, 36 y 37 eran potentes y selectivos. Los compuestos 27 y 28 eran altamente selectivos y eran 10 veces más potentes que NTZ y TIZ, cada uno con $CE_{50} = 0,1 \mu\text{g/ml}$ y $CC_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$.

La tabla 1 presenta los datos del ensayo celular de gripe A para las tiazolidas.

10 TABLA 1. Resultados del ensayo celular de gripe A (PR8, células MDCK).

N.º	Producción de viriones		Toxicidad	I. S.
	CE_{50}	CE_{90}		
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$		
1	1	7	>50	>50
2	1	9	>50	>50
3	0,4	2,5	>50	>125
14	1	8	20	20
15	1	7	30	30
16	1	8	20	20
17	3	9	>50	>16,7
27	0,1	0,8	>50	>500
28	0,1	0,7	>50	>500
29	10	>50	>50	>5
30	10	>50	>50	>5
31	>50	>50	>50	ND
32	>50	>50	>50	ND
33	>50	>50	>50	ND
34	>50	>50	>50	ND
35	>50	>50	>50	ND
36	1	8	>50	>50
37	0,6	15	>50	>83,3
38	25	>50	>50	>2
39	10	30	>50	>5
51	3,5	9	30	9
52	30	>50	>50	>1,6
53	10	>50	>50	>5
54	10	>50	>50	>5
59	5	30	>50	>10
63	10	>50	>50	>5
64	>50	>50	>50	ND
65	>50	>50	>50	ND
66	>50	>50	>50	ND

Las tiazolidas actúan a un nivel posterior a la entrada. Para investigar si el tratamiento con tiazolidas antes de la adsorción del virus puede proteger a las células huésped de la infección viral, se trataron células MDCK con TIZ 10 $\mu\text{g/ml}$ durante 12, 6 ó 3 h. En los tiempos indicados, se retiró el fármaco, y se lavaron las monocapas de células tres veces antes de la infección con el virus PR8. Tal como se muestra en la figura 1D (previo), el pretratamiento de células con tizoxanida (2) hasta 12 h antes de la infección viral no tuvo ningún efecto sobre la replicación del virus de la gripe. Además, el tratamiento del inóculo viral (datos no mostrados) o el tratamiento de células sólo durante el

15

periodo de adsorción no inhibió la replicación del virus (figura 1D), lo que indica que el fármaco no está afectando directamente a la infectividad del virus ni a su unión a, o entrada en, las células diana. El tratamiento con TIZ iniciado entre 0 y 3 h p.i. fue el más eficaz en la inhibición de la replicación del virus (figura 1D, posterior). El tratamiento iniciado a las 6 h p.i. fue menos eficaz, pero todavía podía inhibir la replicación del virus, mientras que el fármaco no fue eficaz cuando se administró a las 12 h p.i. Una sola administración del fármaco después de la adsorción del virus fue eficaz en la inhibición de la replicación del virus durante al menos 48 h después de la infección (figura 1E).

Las tiazolidas alteran selectivamente la maduración viral de la hemaglutinina. Para investigar si la actividad antiviral de las tiazolidas estaba provocada por alteraciones de la síntesis de proteínas, se marcaron células infectadas de manera simulada o infectadas con PR8 tratadas con TIZ poco después de la adsorción del virus con [³⁵S]-metionina-cisteína ([³⁵S]-Met/Cys) a diferentes tiempos p.i., y se analizaron las proteínas mediante SDS/PAGE y autorradiografía, o análisis por inmunotransferencia de tipo Western. Tal como se muestra en la figura 2A, TIZ no inhibió la síntesis de proteínas del huésped (parte inferior), ni provocó alteraciones detectables en el patrón electroforético de los polipéptidos sintetizados (parte superior); además, TIZ no afectó a la fosforilación del factor de iniciación eucariota 2α (eIF2-α) (parte central) ni en células no infectadas ni en las infectadas con PR8. Se halló que las principales proteínas del virus de la gripe se sintetizaron en grandes cantidades en células no tratadas a partir de las 4 h p.i.; no se detectaron cambios importantes en la síntesis de proteínas del virus de la gripe en células tratadas, con la excepción de la desaparición de una banda de aproximadamente 79 kDa de peso molecular, que posteriormente se identificó como la isoforma madura del precursor de hemaglutinina, y la aparición simultánea de una banda de migración más rápida de 74 kDa (figura 2A).

Para determinar si el tratamiento con TIZ altera selectivamente la síntesis de HA, se marcaron metabólicamente células MDCK infectadas de manera simulada o infectadas con PR8 tratadas con TIZ (10 µg/ml) a las 5 h p.i. (pulso de 4 h), y se sometieron a inmunoprecipitación las proteínas radiomarcadas con anticuerpos monocionales anti-hemaglutinina y luego se procesaron para SDS-PAGE y autorradiografía. Los datos mostrados en la figura 2B identifican la proteína cuya movilidad electroforética se ve alterada por TIZ como el precursor HA0 viral. Para determinar si la modificación de HA0 inducida por TIZ era transitoria, se marcaron metabólicamente células MDCK infectadas de manera simulada o infectadas con PR8 tratadas con TIZ (10 µg/ml) o con el inhibidor de la N-glicosilación tunicamicina (TM, 5 µg/ml) a las 3 h p.i. durante las siguientes 15 h, y se analizaron las proteínas mediante SDS/PAGE y autorradiografía. Alternativamente, se marcaron células infectadas con PR8 a las 5 h p.i. y luego se cazaron en presencia de metionina fría 10 mM y cicloheximida 1 mM durante las siguientes 3 h p.i. Tal como se muestra en la figura 2C, la modificación postraduccional de HA0 inducida por TIZ todavía era evidente a las 18 h p.i., y parecía que difería de la alteración inducida por TM, tal como indica el patrón de movilidad electroforética diferente de las dos formas de HA0; además, mientras que TM provocó una disminución en la acumulación de HA0, tal como se describió previamente, el tratamiento prolongado con TIZ no redujo los niveles intracelulares de HA0 en células infectadas. A diferencia de TM, TIZ no indujo la expresión de la proteína de estrés regulada por glucosa Grp78/BiP, un marcador de la respuesta de proteína desplegada, en células MDCK (la figura 2C). Los resultados a partir del experimento de caza indicaron que, en las células no tratadas, HA0 alcanzó la forma madura de 79 kDa entre 10 y 20 min después de la síntesis, mientras que en presencia de TIZ, la forma de HA0 de 74 kDa de migración más lenta comenzó a aparecer más tarde (30 min) después de la síntesis (figura 2D), y no fue detectable ningún cambio adicional en la movilidad electroforética en las siguientes 2,5 horas (datos no mostrados).

Para determinar si TIZ inhibe la glicosilación de HA0, se trataron células infectadas con PR8 con TIZ o tunicamicina después de la adsorción del virus y, a las 6 h p.i., se marcaron con [³⁵S]-Met/Cys, [³H]-glucosamina o [³H]-manosa. Tal como se muestra en la figura 3A, mientras que TM impidió por completó la glicosilación de HA0, el tratamiento con TIZ no disminuyó la glucosamina y, de hecho, aumentó la incorporación de manosa en la forma inmadura de HA0. Sin embargo, parece que la tiazolida actúa de manera diferente a los inhibidores de α-manosidasa I, 1-desoximanojirimicina, y α-manosidasa II, swainsonina, tal como indica la movilidad electroforética diferente de HA0 inmaduro inducido por TIZ en comparación con las formas de HA0 presentes en células tratadas con los dos inhibidores (figura 3B).

Se sabe que la maduración de HA se ve influida tanto por la maquinaria de glicosilación de las células huésped como por la cepa del virus. Para determinar si la alteración de HA0 descrita era específica del virus PR8 o era dependiente de la célula, se infectaron células epiteliales pulmonares humanas A549 con la cepa WSN humana de la gripe A, mientras que las células MDCK se infectaron con la cepa aviar A/Ck. En ambos casos, se detectaron alteraciones en la maduración de HA0 análogas a las descritas para la cepa PR8 (figuras 3C y D), lo que indica que TIZ es capaz de inhibir la maduración de HA0, independientemente del tipo de célula huésped y de la cepa de la gripe A. Finalmente, tal como se muestra en las figuras 3E y F, la nitazoxanida provocó alteraciones similares en la hemaglutinina de los virus de la gripe humana (E) y aviar (F).

La tizoxanida inhibe el transporte de HA a la membrana celular e impide que el virus salga de las células huésped. La glicosilación de HA, como otras glicoproteínas de superficie celular, se inicia en el RE, añadiendo oligosacáridos de "alto contenido en manosa". El componente de azúcar rico en manosa se procesa en el aparato de Golgi durante el transporte a la superficie celular, y la glicosilación terminal se produce en las cisternas trans del aparato de Golgi. Para investigar si TIZ puede afectar al paso de HA0 a través del aparato de Golgi, se sometieron alícuotas de proteínas

radiomarcadas y muestras inmunoprecipitadas con HA0 a digestión con endo- β -N-acetilglucosaminidasa H (Endo-H), una enzima que elimina las cadenas de hidratos de carbono unidas a N que no se han glicosilado de manera terminal, o con péptido N-glicosidasa F (PNGasa-F), una enzima que elimina todos los N-glicanos. Tal como se esperaba, ambas formas de la proteína eran sensibles a la digestión con PNGasa-F; sin embargo, mientras que HA0 de células de control se glicosiló de manera terminal volviéndose resistente a Endo-H, HA0 de las células tratadas con TIZ permanecieron sensibles a la digestión con la proteasa hasta 4 h después de la síntesis (figuras 4A y B). Tal como se muestra en la figura 4C, las alteraciones inducidas por TIZ no impidieron la capacidad de HA0 para formar trímeros.

Puesto que la adquisición de resistencia a Endo-H es un marcador del transporte a los compartimentos cis y central del aparato de Golgi, estos resultados indican que la alteración inducida por TIZ puede bloquear el transporte de HA0 entre el RE y el complejo de Golgi, impidiendo su transporte a la membrana plasmática. De hecho, se detectó la inhibición del transporte al compartimento trans-Golgi mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos contra trans-Golgi específicos (figura 4D). Para confirmar que el tratamiento con TIZ inhibía el transporte de HA a la membrana plasmática de la célula huésped impidiendo la salida de partículas virales maduras, se trataron células MDCK infectadas de manera simulada e infectadas con PR8 con TIZ (10 μ g/ml) o tunicamicina (5 μ g/ml) después de la adsorción del virus y se detectaron los niveles de hemaglutinina viral en el citoplasma (figura 5A) y en la membrana plasmática (figura 5B) mediante inmunofluorescencia a las 16 h p.i. Estos estudios confirmaron que, mientras que los niveles de HA0 en el citoplasma de células tratadas con TIZ eran similares al control (figura 5A), los niveles de proteína viral en la membrana plasmática disminuyeron drásticamente en células tratadas con TIZ (figura 5B, parte superior). Además, se confirmó una disminución sustancial en los niveles de HA en la membrana plasmática después del tratamiento con TIZ determinando la función biológica de HA incorporada en la membrana plasmática mediante el ensayo de unión al receptor (hemadsorción de eritrocitos) (figura 5B, parte inferior). En estudios paralelos, después de la transfección transitoria de células MDCK con un mutante de receptor de lipoproteínas de baja densidad humano con internalización defectuosa etiquetado con GFP (plásmido LDLR-A18-GFP), se halló que TIZ no inhibió el direccionamiento a la membrana plasmática del LDLR, lo que sugiere un efecto selectivo de las tiazolididas (figura 11). Se obtuvieron resultados similares después de la transfección transitoria de células MDCK y células HEK-293 con una glicoproteína celular de membrana plasmática diferente, el receptor 4 similar a Toll humano (datos no mostrados).

En muestras paralelas, se marcaron metabólicamente células infectadas de manera simulada e infectadas con PR8 con [35 S]-Met/Cys a las 3 h p.i. durante las siguientes 21 h, y se purificaron los viriones radiomarcados a partir del sobrenadante de células infectadas. Se analizaron las proteínas incorporadas en las partículas virales mediante SDS-PAGE y autorradiografía. Tal como se muestra en la figura 5C, no pudieron detectarse proteínas virales en el sobrenadante de células tratadas con TIZ. Se confirmó la reducción drástica de partículas virales determinando las producciones de viriones de muestras no marcadas paralelas mediante el ensayo de infectividad TCID50 (figura 5D, parte superior) o el ensayo HAU (figura 5D, parte inferior) a las 24 h p.i.

Los estudios de combinación con nitazoxanida y los inhibidores de neuraminidasa zanamivir y oseltamivir contra el virus de la gripe A PR8 demuestran una actividad sinérgica. Con el fin de determinar la actividad antiviral de NTZ en combinación con inhibidores de la gripe clínicos, se sometieron a prueba combinaciones de NTZ con zanamivir y combinaciones de NTZ con oseltamivir a diferentes concentraciones. El zanamivir y el oseltamivir son inhibidores de neuraminidasa (NA) que alteran la liberación eficiente de virus a partir de la célula huésped infectada y actúan mediante un mecanismo claramente diferente al de las tiazolididas.

Se investigó el efecto del tratamiento de combinación de NTZ y zanamivir en células caninas después de la infección con virus H1N1 de mamífero A/PR/8/34 (PR8). Se trataron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) infectadas con virus de la gripe PR8 con diferentes concentraciones de NTZ, zanamivir o vehículo inmediatamente después del periodo de adsorción del virus, y se determinó la producción de viriones a las 24 h posterior a la infección (p.i.).

En estudios independientes, el tratamiento con NTZ provocó una inhibición dependiente de la dosis de la replicación del virus con una CE_{50} de 1 μ g/ml (3,3 M) para el virus PR8 (figura 1B). La tabla 2 a continuación resume los datos antivirales de los experimentos de combinación. La actividad se expresa como reducción de HAU/ml en relación con el control no tratado. En los experimentos con zanamivir, parecía que NTZ era ligeramente más potente que en el estudio previo, y tuvo una CE_{50} de ~0,66 μ g/ml (~2,2 μ M). El zanamivir solo produjo una reducción (inhibición) del 50% en la producción de viriones sólo a la concentración de prueba más alta de 1 μ M, por tanto se determinó que el zanamivir tenía una CE_{50} de 1 μ M en estas condiciones experimentales (figuras 6 y 7, lado izquierdo). Una combinación de zanamivir a 1 μ M con NTZ a 0,1 μ g/ml (0,33 μ M) dio como resultado una reducción del 83% en la replicación viral en relación con el control no tratado, y corresponde a un aumento de potencia de aproximadamente 3 veces en relación con el tratamiento con zanamivir solo (figura 6, lado derecho).

60 Tabla 2. Actividad antigripal de las combinaciones de NTZ y zanamivir

Producción de PR8: HAU/ml				
Nitazoxanida (μ g/ml)	Control	Zanamivir (μ M)		
		0,01	0,1	1

0	48	48	48	24
0,1	48	48	48	8
1	16	16	8	1

El tratamiento con zanamivir solo a 0,1 μ M no tuvo ningún efecto sobre la replicación viral (figura 7, lado izquierdo). Sin embargo, una combinación de zanamivir a 0,1 μ M y NTZ a 1,0 μ g/ml (3,3 μ M) dio como resultado una reducción mayor del 50% en la replicación viral en relación con el tratamiento con NTZ sola (figura 7, lado derecho). Estos

5 resultados corresponden a un aumento de potencia de aproximadamente 6 veces en relación con el tratamiento con zanamivir solo y un aumento de potencia de 2 veces en relación con el tratamiento con NTZ sola. Una combinación de zanamivir a 1,0 μ M y NTZ a 1,0 μ g/ml (3,3 μ M) dio como resultado una reducción del 94% en la replicación viral en relación con el tratamiento con NTZ sola (figura 7, lado derecho). Estos resultados corresponden a un aumento de potencia de aproximadamente 24 veces en relación con el tratamiento con zanamivir solo y un aumento de potencia de 16 veces en relación con el tratamiento con NTZ sola. En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad antiviral de combinaciones de zanamivir y NTZ es sinérgica contra el virus de la gripe A PR8.

10 De manera similar, se investigó el efecto del tratamiento con la combinación de NTZ y oseltamivir en células caninas después de la infección con virus de mamífero H1N1 A/PR/8/34 (PR8). Se trataron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) infectadas con virus de la gripe PR8 con diferentes concentraciones de NTZ, oseltamivir o vehículo inmediatamente después del periodo de adsorción de virus, y se determinó la producción de viriones a las 24 h posteriores a la infección (p.i.).

15 20 En estos experimentos, NTZ demostró una CE₅₀ de 1 μ g/ml (3,3 μ M). No se observó ninguna reducción (inhibición) de la producción de viriones con oseltamivir solo a concentraciones de prueba de hasta 1 μ M, por tanto no se determinó la CE₅₀ para oseltamivir (figuras 8 y 9, lado izquierdo). Una combinación de oseltamivir a 1 μ M con NTZ a 0,1 μ g/ml (0,33 μ M) dio como resultado un aumento del 33% en la reducción de la replicación viral, correspondiente a un aumento de potencia de aproximadamente 1,5 veces en relación con el tratamiento con oseltamivir o NTZ solos (figura 8, lado derecho). Obsérvese que la dosis de NTZ era la décima parte de su CE₅₀ establecida.

25 Una combinación de oseltamivir a 1,0 μ M y NTZ a 1,0 μ g/ml (3,3 μ M) dio como resultado un aumento del 67% en la reducción de la replicación viral en relación con el tratamiento con oseltamivir solo y un aumento del 33% en la reducción de la replicación viral en relación con el tratamiento con NTZ sola (figura 9, lado derecho). Estos resultados corresponden a un aumento de potencia de aproximadamente 3 veces en relación con el tratamiento con oseltamivir solo y un aumento de potencia de 1,5 veces en relación con el tratamiento con NTZ sola. En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad antiviral de combinaciones de oseltamivir y NTZ es entre aditiva y sinérgica contra el virus de la gripe A PR8.

30 35 40 Los resultados a partir de varios enfoques bioquímicos demuestran que TIZ bloque la glicosilación terminal de HA en una etapa anterior a la resistencia a la digestión con endoglicosidasa-H, que es un marcador para el transporte hacia los compartimentos cis y central del aparato de Golgi. Los estudios de inmunomicroscopía y el análisis de partículas virales producidas por las células infectadas confirman que las alteraciones inducidas por TIZ alteran el transporte de HA0 entre el RE y el complejo de Golgi, impidiendo su transporte e inserción en la membrana plasmática de la célula huésped y bloqueando la salida de viriones maduros a partir de las células huésped. Queda por establecer si la alteración de la maduración de HA está provocada por la unión directa de TIZ a la glicoproteína viral o se debe a un efecto mediado por la célula.

45 50 Se ha demostrado previamente que las tiazolidas presentan actividad antiviral contra dos virus de ARN diferentes, hepatitis C (VHC), un virus de ARN de cadena positiva, y rotavirus, un virus de ARN bicatenario, y un virus de ADN, el virus de la hepatitis B (VHB). La actividad antiviral de amplio espectro sugiere un efecto mediado por la célula más que una diana viral específica. La posibilidad de que la maduración de glicoproteínas virales pueda estar implicada en la actividad antiviral contra VHB y VHC se encuentra actualmente en estudio. En el caso de rotavirus, recientemente se ha demostrado la modificación inducida por TIZ de la glicoproteína viral estructural VP7 (Santoro MG y Rossignol JF, resultados no publicados), lo que respalda la hipótesis de que la maduración y el transporte de glicoproteínas virales clave puede ser un mecanismo general de la actividad antiviral de esta nueva clase de fármacos. El hallazgo de que las tiazolidas no afectan significativamente a la replicación de rinovirus humano, un picornavirus cuya maduración no requiere que se transporten las glicoproteínas virales a la membrana celular, respalda adicionalmente la hipótesis.

55 Las abreviaturas usadas son: NTZ, nitazoxanida; TIZ, tizoxanida; CE₅₀, concentración eficaz en el 50%; CC₅₀, concentración citotóxica en el 50%; HA, hemaglutinina; TM, tunicamicina; Endo-H, endo- β -N-acetilglucosaminidasa H; PNGasa-F, péptido N-glicosidasa F; TCID₅₀, dosis infectante del 50% del histocultivo; SW, swainsonina; DMJ, 1-desoximanojirimicina; HAU/ml, unidades hemaglutinantes/ml, EGS, bis(succinimidylsuccinato) de etilenglicol.

60 65 Administración de baja dosis de tiazolidas tales como NTZ para tratar una infección viral. NTZ puede administrarse

por vía oral a una dosis de 300 mg o 600 mg dos veces al día durante 5 días como tratamiento de la gripe. Los ensayos clínicos han demostrado que esta pauta posológica tiene la capacidad de tratar la gripe. Preferiblemente, la dosificación de nitazoxanida es de 300 mg dos veces al día durante 5 días, que es menor que la dosificación de NTZ necesaria para tratar infecciones intestinales, permitiendo de ese modo una reducción de los efectos secundarios asociados con mayores dosificaciones. Las tiazolidas también pueden administrarse como comprimido bicapa de liberación modificada. Como tal, las tiazolidas pueden administrarse en dosis de 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg o 600 mg dos veces al día durante 5 días para tratar una infección viral.

5 También se ha hallado que las tiazolidas tales como la nitazoxanida tienen actividad contra otros virus respiratorios.
 10 En la tabla 3 se presentan los datos *in vivo*.

Tabla 3: actividad contra otros virus respiratorios

Virus	CE ₅₀ (μg/ml)	CC ₅₀ (μg/ml)
Paragripal	0,5	>50
Coronavirus	1,0	>50
Adenovirus	0,2	>50
Virus sincitial respiratorio	0,5	>50
Rinovirus	>10	>50

15 Curiosamente, las tiazolidas tales como NTZ también tienen la capacidad de tratar a pacientes con una enfermedad similar a la gripe (ILI). La enfermedad similar a la gripe presenta síntomas de la gripe, que pueden estar provocados por otro virus o patógeno.

20 Se llevó a cabo la evaluación del efecto de nitazoxanida dos veces al día durante 5 días sobre la duración de los síntomas en pacientes pediátricos y adultos con enfermedades similares a la gripe. Se llevaron a cabo dos ensayos controlados por placebo con doble enmascaramiento. Se les proporcionó a niños de 12 meses - 11 años una suspensión de NTZ (n=100, 50 por grupo) y se les proporcionó a pacientes ≥ 12 años comprimidos de 500 mg de NTZ (n=86, 43 por grupo). Se llevaron a cabo ensayos monocéntricos. Los estudios se basaron en ensayos TAMIFLU®. Los ensayos siguieron criterios de inclusión/exclusión específicos. La inclusión incluyó niños de 1-11 años y de pacientes ≥ 12 años con fiebre > 100°F con ≥ 1 síntoma respiratorio (incluyendo tos, ronquido, estornudos, dolor de garganta, etc.) y/o con ≥ 1 síntoma constitucional (mialgia, malestar general, cansancio, cefalea, escalofríos/sudoración, etc.). Las principales exclusiones incluyeron una duración de síntomas > 72 horas, embarazo o lactancia materna, antibióticos/medicamentos antivirales concurrentes o antecedentes de asma u otra enfermedad pulmonar.

25 30 35 Se aleatorizaron los pacientes para recibir NTZ o placebo b.i.d. (dos veces al día) durante 5 días. Se recogió un frotis nasofaríngeo antes de iniciar el tratamiento para un ensayo rápido de inmunofluorescencia directa (reactivo para detección respiratoria SimulFluor) para 7 virus (VSR, gripes A y B, paragripales 1-3 y adenovirus). El paciente (o familiar) registró los síntomas en un diario, clasificando cada síntoma en una escala de 0 a 3: ausente, leve, moderado, grave. Se almacenó tejido en una bolsa de plástico con cierre de cremallera y se recogió diariamente por el personal del estudio para su pesaje. Se llevó a cabo una exploración física de seguimiento el día 7. El criterio de valoración primario fue el tiempo desde antes de iniciar el tratamiento hasta que cada síntoma volvió a ser ausente o leve (<2). Los criterios de valoración secundarios incluyen el uso de antibióticos, síntomas respiratorios en el día 7, peso diario de tejido/moco.

40 45 50 Los resultados a partir de enfoques bioquímicos adicionales demuestran que la nitazoxanida tiene un efecto sobre virus respiratorios adicionales. Véanse la tabla 4 para la distribución de pacientes y la tabla 5 para la detección de virus. La tabla 5 muestra que la mayoría de los pacientes no dieron un resultado de prueba positivo para la presencia de adenovirus, VSR, gripe A, paragripal 1. Sin embargo, las figuras 12-15 muestran que NTZ tiene la capacidad de tratar a pacientes que padecen una enfermedad similar a la gripe. Sorprendentemente, estos datos muestran que los pacientes que presentan síntomas de la gripe, pero no dieron un resultado de prueba positivo para adenovirus, VSR, gripe A, paragripal 1, pueden tratarse con tiazolidas tales como NTZ.

Tabla 4: pacientes

	Niños (<12 años)		Adultos (≥12 años)	
	NTZ	Placebo	NTZ	Placebo
Sexo (H/M)	24/26	29	10/33	17/26
Edad, años (media ± D.E.)	4,0 ± 2,8	3,5 ± 2,3	28,9 ± 13,3	31,4 ± 12,7
Edad, años (intervalo)	1-9	1-11	12-61	12-61

Peso, kg (media ± D.E.)	15,4 ± 6,0	14,8 ± 4,8	56,2 ± 11,2	58,9 ± 10,5
Síntomas (%)				
Secreción nasal	100%	100%	100%	98%
Obstrucción nasal	80%	76%	79%	86%
Estornudos	92%	96%	91%	98%
Dolor de garganta	84%	80%	93%	81%
Fiebre	84%	80%	86%	81%
Tos	94%	92%	94%	86%
Malestar general	92%	88%	91%	88%
Cefalea	70%	66%	70%	79%
Escalofríos	60%	50%	65%	60%

Tabla 5: virus detectados mediante ensayo rápido

	Niños (<12 años)		Adultos (≥12 años)	
	NTZ	Placebo	NTZ	Placebo
Adenovirus (n, %)	4 (8%)	8 (16%)	2 (5%)	2 (5%)
VSR (n, %)	-	1(2%)	1(2%)	3 (7%)
Gripe A (n, %)	2 (4%)	-	1 (2%)	-
Paragripal 1 (n, 5)	1 (2%)	-	-	-
Ninguno (n, %)	43 (86%)	41 (82%)	39 (91%)	38 (88%)

5 Leyendas de las figuras

Figura 1. Las tiazolididas inhiben la replicación del virus de la gripe A actuando a nivel posterior a la entrada. A, estructura de nitazoxanida (NTZ) y tizoxanida (TIZ). B, NTZ (círculos azules) y TIZ (círculos rojos) inhiben la replicación de cepas del virus de la gripe A humanas (PR8, WSN) y aviares (A/Ck) en células MDCK. La producción de viriones se determinó a las 24 h p.i. C, actividad antiviral de TIZ sobre el virus de la gripe A PR8 en células monocíticas humanas U937 (●) y linfoblastoideas T Jurkat (▲) y sobre el virus WSN en células epiteliales pulmonares humanas A549 (■). D, se trataron células MDCK con TIZ 10 µg/ml (barras rellenas) en los tiempos indicados antes de la infección (previo), inmediatamente después del periodo de adsorción (posterior), o sólo durante el periodo de adsorción (Ad, barra de trazos). La barra vacía representa el control infectado no tratado (C). E, actividad antiviral a largo plazo de TIZ en células MDCK infectadas con PR8 tratadas con TIZ 10 µg/ml (círculos rellenos) o vehículo (círculos vacíos) después de la adsorción del virus. B-E, la producción de viriones, expresada en HAU/ml (B y E) o como porcentaje del control no tratado (C y D), representa la media ± D.E. de muestras duplicadas a partir de un experimento representativo de tres con resultados similares. * $=P<0,01$; ** $=P<0,05$

Figura 2. La tizoxanida altera selectivamente la maduración de hemaglutinina de la gripe. A, efecto de TIZ sobre la cinética de síntesis de proteínas del virus PR8. Autorradiografía de proteínas marcadas con [³⁵S]-Met/Cys (pulso de 1,5 h) a diferentes tiempos p.i. de células infectadas de manera simulada (U) o infectadas con PR8 tratadas con TIZ 10 µg/ml después de la adsorción del virus (parte superior). Se indican las proteínas virales. En el mismo experimento, se determinó la síntesis de proteínas mediante la incorporación de [³⁵S]-Met/Cys en las proteínas de células tratadas con TIZ (●) o vehículo (○) (parte inferior), y se determinaron los niveles de proteína fosfo-eIF-2 α mediante análisis por inmunotransferencia usando anticuerpos panespecíficos anti-fosfoSer-51-eIF2 α (p-eIF2 α) o anti-eIF2 α (parte central). B, identificación de hemaglutinina mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA después del marcaje con [³⁵S]-Met/Cys a las 5 h p.i. (pulso de 4 h). Se muestran las proteínas inmunoprecipitadas (+ α HA, IP) y las proteínas radiomarcadas de las mismas muestras antes de la adición de anticuerpos (- α HA). Se indican las posiciones del precursor de HA no escindido (HA0). C, autorradiografía de proteínas marcadas con [³⁵S]-Met/Cys (pulso de 15 h) de células infectadas de manera simulada (U) o infectadas con PR8 tratadas con TIZ 10 µg/ml, tunicamicina (TM) 5 µg/ml o vehículo (C) después de la adsorción del virus. El triángulo blanco y la flecha negra indican GRP78/BiP inducida con TM y HA0 no glicosilado [identificados mediante inmunotransferencia (no mostrado)], respectivamente. D, autorradiografía de proteínas marcadas con [³⁵S]-Met/Cys (pulso de 15 min a las 5 h p.i., seguido por caza para los tiempos indicados) de células infectadas con PR8 tratadas como en A. A-D, las formas de HA0 de migración más lenta y más rápida en células no tratadas o tratadas con TIZ se identifican por un asterisco y por un triángulo negro, respectivamente.

Figura 3. Las tiazolididas interfieren con la N-glicosilación de hemaglutinina viral. A, se trataron células MDCK infectadas

de manera simulada (U) o infectadas con PR8 (PR8) con TIZ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, TM 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o vehículo (C) después de la adsorción del virus. A las 6 h p.i., se marcaron las células durante 4 h con [^{35}S]-Met/Cys (parte superior), [^3H]-glucosamina (parte central) o [^3H]-manosa (parte inferior). Se procesaron las muestras radiomarcadas para SDS-PAGE y autorradiografía. Se muestran secciones de los fluorogramas de geles de SDS/PAGE. Las flechas blancas indican Grp78/BiP inducida con TM. B, se trataron células MDCK infectadas de manera simulada (U) o infectadas con PR8 con TIZ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, swainsonina (SW) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1-desoximanojirimicina (DMJ) 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o vehículo (C) después de la adsorción del virus. A las 6 h p.i., se marcaron las células con [^{35}S]-Met/Cys (pulso de 4 h), y se procesaron las muestras radiomarcadas para SDS-PAGE y autorradiografía. C-D, autorradiografía de proteínas radiomarcadas de células A549 infectadas de manera simulada (U) o infectadas con WSN (WSN) (C) y células MDCK infectadas de manera simulada o infectadas con el virus de la gripe A aviar (A/Ck) (D) tratadas con TIZ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tunicamicina (TM) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o vehículo (C) después de la adsorción del virus. A las 3 h (WSN) o 6 h (A/Ck) p.i., se marcaron las células con [^{35}S]-Met/Cys durante 15 h (WSN) o 4 h (A/Ck). E-F, autorradiografía de proteínas radiomarcadas de células MDCK infectadas de manera simulada (U), infectadas con PR8 (PR8) (E), o infectadas con el virus de la gripe A aviar (A/Ck) (F) tratadas con TIZ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, nitazoxanida (NTZ) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o vehículo (C) después de la adsorción del virus. A las 6 h p.i., se marcaron las células con [^{35}S]-Met/Cys durante 4 h. A-F, se indican proteínas virales HA0, NP, M1 y NS1. Las formas de HA0 de migración más lenta y más rápida en células no tratadas o tratadas con tiazolidina se identifican por un asterisco y por un triángulo, respectivamente.

Figura 4. La tizoxanida bloquea la maduración de HA en una etapa sensible a EndoH. A, se marcaron células MDCK infectadas de manera simulada (U) o infectadas con PR8 (PR8) tratadas con TIZ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (+) o vehículo (-) después de la adsorción del virus con [^{35}S]-Met/Cys (pulso de 4 h) a las 5 h p.i. Las proteínas radiomarcadas se digirieron (+) o no (-) con PNGasa-F o Endo-H, y se procesaron para SDS-PAGE y autorradiografía. Se indican las formas de precursor de hemaglutinina glicosilada (HA0) y no glicosilada (HAp) no escindidas. B, se marcaron células MDCK tratadas como en A con [^{35}S]-Met/Cys (pulso de 4 h) a las 6 h p.i. Se inmunoprecipitaron las proteínas radiomarcadas con anticuerpos anti-HA (a-HA), se digirieron (+) o no (-) con Endo-H y se procesaron para SDS-PAGE. Se muestran secciones de fluorogramas. C, se incubaron extractos de células completas de células MDCK infectadas de manera simulada (U) e infectadas con PR8 (PR8) tratadas con TIZ (+) o vehículo (-) con (+) o sin (-) el reactivo de reticulación EGS (0,2 mM) y se procesaron para inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos anti-HA. Se indican los monómeros (1), dímeros (2) y trímeros (3) de HA. A-C, las formas de HA de migración más lenta y más rápida en células no tratadas o tratadas con TIZ se indican por un asterisco y por un triángulo, respectivamente. D, inmunofluorescencia de células A549 infectadas de manera simulada (U) e infectadas con WSN tratadas con TIZ (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o vehículo durante 24 h, marcadas con anticuerpos anti-p230 trans-Golgi (rojo) y anti-HA (verde). Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). Se muestra la superposición de los tres fluorocromos (fusión). Las áreas ampliadas (insertos) destacan la localización de HA en células no tratadas y tratadas con TIZ. Las imágenes se capturaron y deconvolucionaron con un microscopio DeltaVision usando el software SoftWoRx-2.50. Barra=5 μm .

Figura 5. La tizoxanida inhibe el transporte de hemaglutinina de la gripe a la superficie celular. A, se detectaron los niveles de hemaglutinina (verde) y α -tubulina (rojo) total en células MDCK infectadas de manera simulada (U) e infectadas con PR8 no tratadas o tratadas con TIZ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a las 16 h p.i. mediante inmunofluorescencia indirecta (barra=10 μm). Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). Se muestra la superposición de los tres fluorocromos (fusión). Las imágenes se capturaron y deconvolucionaron con un microscopio DeltaVision usando el software SoftWoRx-2.50. B, se detectaron los niveles de hemaglutinina en la membrana plasmática (verde) a las 16 h p.i. mediante inmunofluorescencia indirecta (parte superior) en células infectadas de manera simulada o infectadas con PR8 tratadas con TIZ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o TM 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los núcleos se tiñen con Hoechst 33342 (azul). Se procesaron las imágenes como en A (barra=10 μm). Se muestra la superposición de los dos fluorocromos. Se muestra la hemadsorción de eritrocitos sobre la membrana plasmática a las 5 h p.i. en muestras paralelas (parte inferior) (barra=35 μm). Se cuantificaron espectrofotométricamente los niveles de hemoglobina de los eritrocitos unidos ($\lambda=540$ nm). Los datos, expresados en densidad óptica (D.O.), representan la media \pm D.E. de muestras duplicadas a partir de un experimento representativo de dos con resultados similares. *=P<0,05 frente al control infectado. C, autorradiografía de proteínas marcadas con [^{35}S]-Met/Cys incorporadas en partículas virales purificadas a las 24 h p.i. a partir de sobrenadantes de células infectadas de manera simulada o infectadas con PR8 tratadas como en B. Se indican las proteínas virales (HA, NP, M1). D, en paralelo, se determinó la producción de viriones en células infectadas con PR8 no tratadas (barras vacías) o tratadas con TIZ (barras llenas) a las 24 h p.i. mediante el ensayo de infectividad (parte superior) y el ensayo de hemaglutinación (parte inferior). Los datos, expresados en TCID50/ml y HAU/ml, respectivamente, representan la media \pm D.E. de muestras duplicadas a partir de un experimento representativo de dos con resultados similares. *=P<0,05 frente al control infectado.

Figura 6. Actividad antiviral de zanamivir a tres concentraciones y zanamivir combinado con nitazoxanida a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ contra la gripe A. Se sometió a prueba zanamivir solo contra la gripe A (MDCK/PR8) a dosis de 0,01, 0,1 y 1,0 μM y en presencia de NTZ a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Figura 7. Actividad antiviral de zanamivir a tres concentraciones y zanamivir combinado con nitazoxanida a 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ contra la gripe A. Se sometió a prueba zanamivir solo contra la gripe A (MDCK/PR8) a dosis de 0,01, 0,1 y 1,0 μM y en presencia de NTZ a 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Figura 8. Actividad antiviral de oseltamivir a tres concentraciones y oseltamivir combinado con nitazoxanida a 0,1 ug/ml contra la gripe A. Se sometió a prueba oseltamivir solo contra la gripe A (MDCK/PR8) a dosis de 0,01, 0,1 y 1,0 μ M y en presencia de NTZ a 0,1 μ g/ml.

Figura 9. Actividad antiviral de oseltamivir a tres concentraciones y oseltamivir combinado con nitazoxanida a 1,0 ug/ml contra la gripe A. Se sometió a prueba oseltamivir solo contra la gripe A (MDCK/PR8) a dosis de 0,01, 0,1 y 1,0 M y en presencia de NTZ a 1,0 μ g/ml.

Figura 10. Actividad antiviral de tizoxanida contra los virus de las gripes A y B. A, se infectaron células MDCK con cuatro cepas del virus de la gripe A diferentes, el H1N1 de mamífero PR8 y WSN, y el H3N2 A/FI, y el H5N9 cepa aviar A/Ck a una m.o.i. de 10 HAU/10⁵ células, y se trataron con TIZ 10 μ g/ml (barras rellenas) o vehículo (barras vacías) inmediatamente después del periodo de adsorción. Se determinó la producción de viriones a las 24 h p.i. B, actividad antiviral a largo plazo de TIZ en células MDCK infectadas con el virus de la gripe B (B/Parma/3/04) y tratadas con TIZ 10 μ g/ml (●) o vehículo (★) después de la adsorción del virus. C-D, se realizaron curvas de crecimiento del virus PR8 en una sola etapa (C) y en múltiples etapas (D) sobre células MDCK infectadas a una m.o.i. de 10 (C) o 0,001 (D) uff/célula y tratadas con TIZ 10 μ g/ml (●) o vehículo (★) como en A. Se determinó la producción de viriones en los tiempos p.i. indicados. (A-D) La producción de viriones, expresada como porcentaje del control no tratado (A) o en HAU/ml (B-D), representa la media \pm D.E. de muestras duplicadas a partir de un experimento representativo de tres con resultados similares. *=P<0,01; **=P<0,05.

Figura 11. La tizoxanida no influye en el direccionamiento a la membrana plasmática del receptor de lipoproteínas de baja densidad humano (LDLR). Se transfectaron de manera transitoria células MDCK con mutante de receptor de lipoproteínas de baja densidad humano (hLDLR) con internalización defectuosa etiquetado con proteína verde fluorescente (GFP) (plásmido LDLR-A18-GFP) (40) y, después de 8 h, se trataron con TIZ (10 μ g/ml) o vehículo durante las siguientes 16 h. Después de bloquear la síntesis de proteínas con cicloheximida durante 1 h, se tiñeron las membranas plasmáticas usando tinte de membrana plasmática CellMask™ Orange (PM), y se obtuvieron imágenes usando un microscopio de fluorescencia DM-IL de Leica equipado con filtros de excitación UV. Se capturaron las imágenes con una cámara DC-300 de Leica usando el software Image-Manager500 de Leica. Se detectaron los niveles de LDLR-GFP (verde) y PM (rojo) en células MDCK transfectadas no tratadas (paneles superiores) o tratadas con TIZ (paneles inferiores). Se muestra la superposición de los dos fluorocromos (fusión). Se muestran secciones de las mismas imágenes (barra=10 μ m) de un experimento representativo.

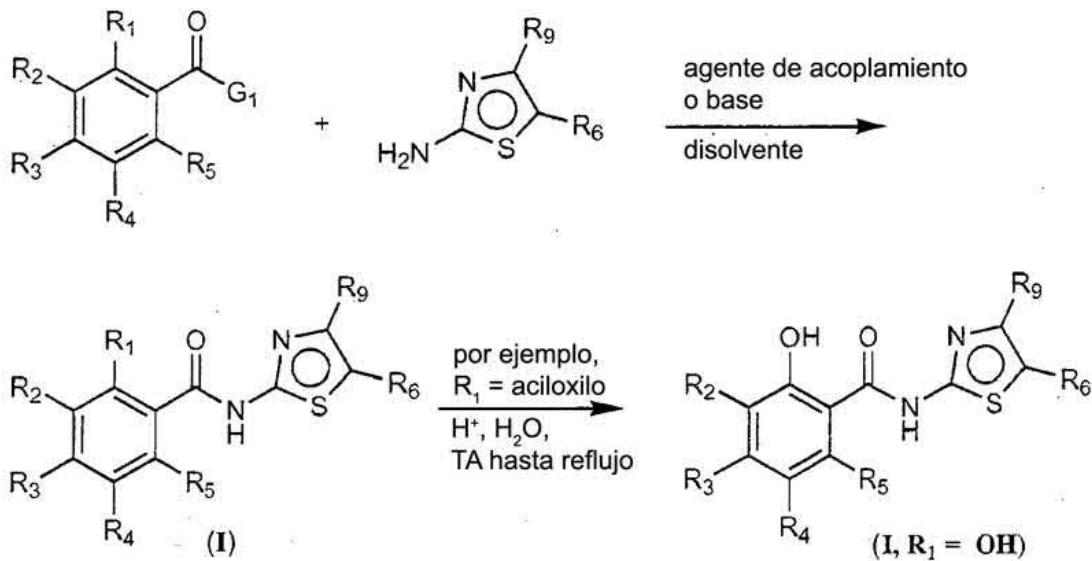
Figura 12. La nitazoxanida puede resolver los síntomas asociados con una enfermedad similar a la gripe.

Figura 13. Datos de la exploración física del día 7: la nitazoxanida reduce los síntomas respiratorios asociados con una enfermedad similar a la gripe después.

Figura 14. Uso de antibióticos posteriores al estudio.

Figura 15. Peso de la recogida diaria de tejido.

Los compuestos (I) para su uso en los métodos de la presente invención pueden sintetizarse según el esquema general a continuación, en el que R₆ y R₉ pueden seleccionarse de nitró (NO₂) y SO₂R₁₂, haciendo reaccionar un derivado de aroílo, en el que G₁ es hidroxilo, cloro, fluoro, bromo, alcoxilo, y similares, con un derivado de aminotiazol, tal como se define en el presente documento, en condiciones de reacción adecuadas. En algunas realizaciones, la reacción puede estar representada genéricamente de la siguiente manera:



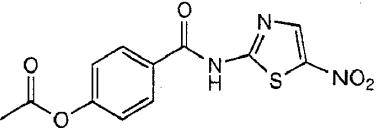
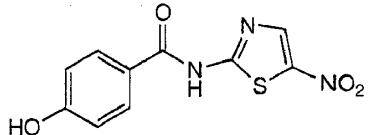
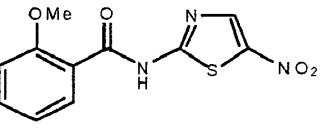
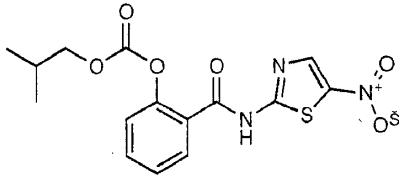
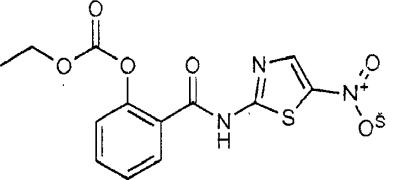
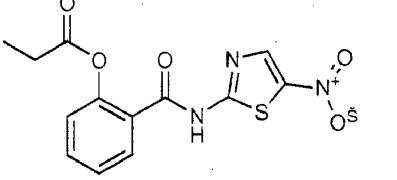
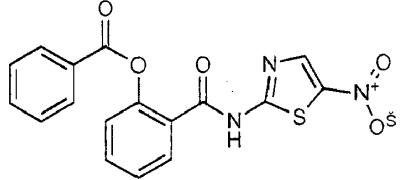
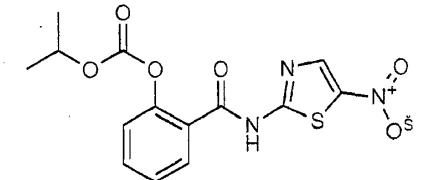
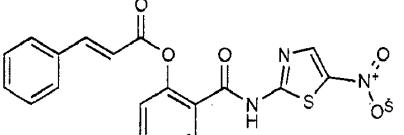
Los compuestos (I) para su uso en los métodos de la presente invención también pueden sintetizarse según los procedimientos publicados en los documentos US3950351, US6020353, PCT WO2006042195A1 y 5 US2009/0036467A.

Los ejemplos de compuestos para su uso en los métodos de la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, los siguientes compuestos enumerados en la tabla 6. No se pretende que este conjunto de ejemplos limite la invención.

10

Tabla 6: ejemplos de la invención

N.º	Compuesto	p.f. (°C)
1		202
2		254
3		>300
4		203-205
5		259-260

6		246-248 (desc.)
7		263-265
8		230-232 (desc.)
14		125,3-132,3
15		159,4-161,4
16		158,5-160,5
17		229,4-230,4
18		180,3-182,3
19		166,2-167,0

20	SAL DE HCl 	230 (desc.)
21	SAL DE HCl 	244-245
22	.SAL DE HCl 	138,5-140
27		175,6-178,8
28		231-235
29		167,3-169,3
30		260-261

31		209,0-212,0
32		258,0-259,0 (desc.)
33		185,7-188,7
34		242,0-246,0 (desc.)
35		253,0-255,0 (desc.)
36		141-145
37		201-203

38		152-155
39		247-250
40		181,0-186,5
41		234,7-240,0
42		158,7-160,8
43		192-197
44		235-238

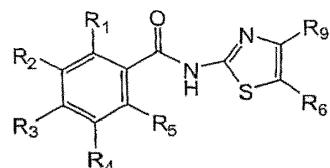
49		166,9-169,0
50		229-230
51		no determinado
52		173-175
53		282-283
54		no determinado
55		145-147
56		225-226
57		100-101

58		180-181
59		138-140
60		235-236
61		135,2-136,2
62		193,5-195,5
63		279,6-280,6
64		252,5-255,5
65		186,5 (desc.)
66		271,1-272,3

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende

5 i) una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, o de una sal o un éster del mismo,



Fórmula I

10 en la que uno de R₁, R₂, R₃ es OH o OC(=O)Q, en el que Q es R₇, OR₇ o NHR₇; R₇ es alquilo inferior, arilo o heteroarilo y está opcionalmente sustituido; R₄, R₅ y el resto de R₁, R₂ y R₃ son H; y o bien R₆ es NO₂ y R₉ es H o bien R₆ es H y R₉ es SO₂R₁₂, en el que R₁₂ es alquilo inferior, arilo o heteroarilo y está opcionalmente sustituido;

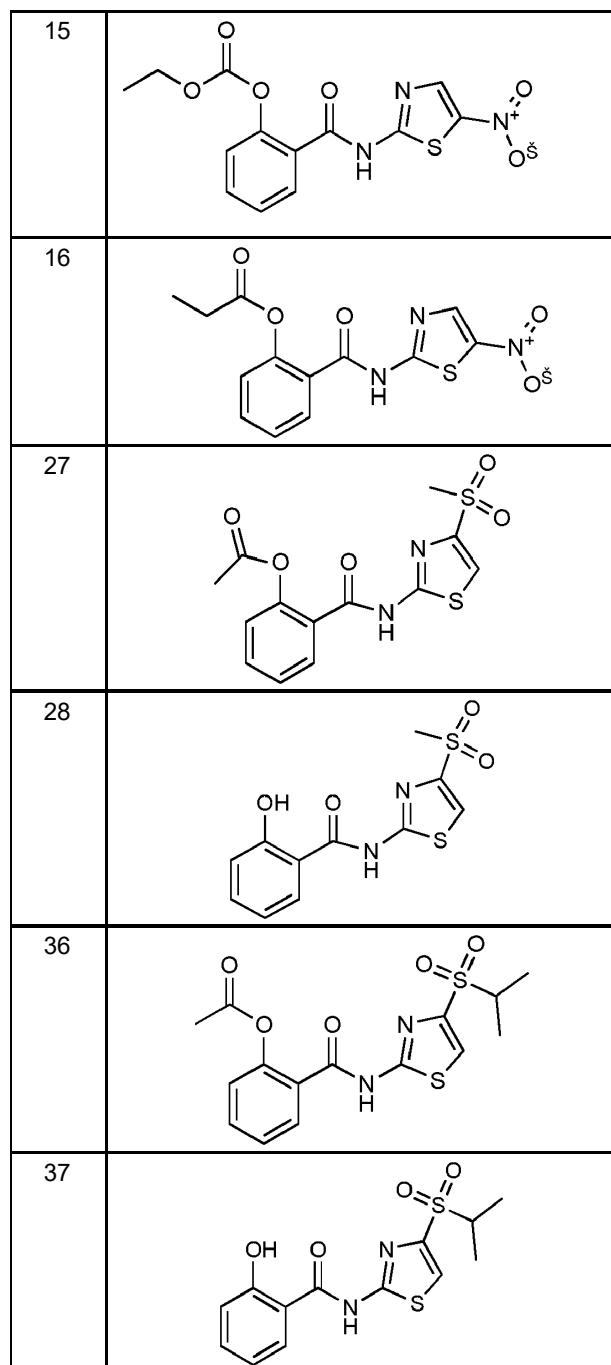
15 en la que el término "inferior" significa que tiene 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de carbono; y

20 ii) un portador farmacéuticamente aceptable para su uso en un método de prevención o tratamiento de una infección gripe mediante el bloqueo de la maduración de hemaglutinina viral en una etapa anterior a la resistencia a la digestión con endoglicosidasa.

25 2. Composición farmacéutica para su uso en un método según la reivindicación 1, en la que el compuesto de fórmula I es nitazoxanida, tizoxanida, o una sal o un éster de las mismas.

3. Composición farmacéutica para su uso en un método según la reivindicación 1, en la que el compuesto de fórmula I es un compuesto mostrado en la siguiente tabla, fórmulas 1-3, 14-16, 27, 28, 36 y 37:

N.º	Compuesto
1	
2	
3	
14	



4. Composición farmacéutica para su uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el compuesto de fórmula I se administra en combinación con un inhibidor de neuramidasa, una vacuna, un inmunoestimulante, un análogo de adamantano, una proteína de fusión de sialidasa recombinante, un oligonucleótido antisentido o un interferón pegilado; en la que el análogo de adamantano se selecciona del grupo que consiste en amantadina y rimantadina.
5. Composición farmacéutica para su uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el compuesto de fórmula I se administra en combinación con una vacuna y un inmunoestimulante.
10. 6. Composición farmacéutica para su uso en un método según la reivindicación 4 ó 5, en la que el inhibidor de neuramidasa se selecciona del grupo que consiste en oseltamivir, zanamivir, permivir, RWJ-270201, DANA y CS-8958, y el inmunoestimulante es polioxidonio.
15. 7. Composición farmacéutica para su uso en un método según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que la combinación se administra de manera secuencial o de manera sustancialmente simultánea.

8. Composición farmacéutica para su uso en un método según la reivindicación 1, en la que la infección gripeal está provocada por un virus seleccionado de H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 y H10N7.
- 5 9. Kit que comprende (a) un compuesto de fórmula I según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y (b) un inhibidor de neuraminidasa o un inmunoestimulante para su uso en un método de tratamiento de la gripe.
10. 10. Kit para su uso en un método según la reivindicación 9, en el que el inhibidor de neuraminidasa se selecciona del grupo que consiste en oseltamivir, zanamivir, permivir, RWJ-270201, DANA y CS-8958, y el inmunoestimulante es polioxidonio.

FIGURA 1

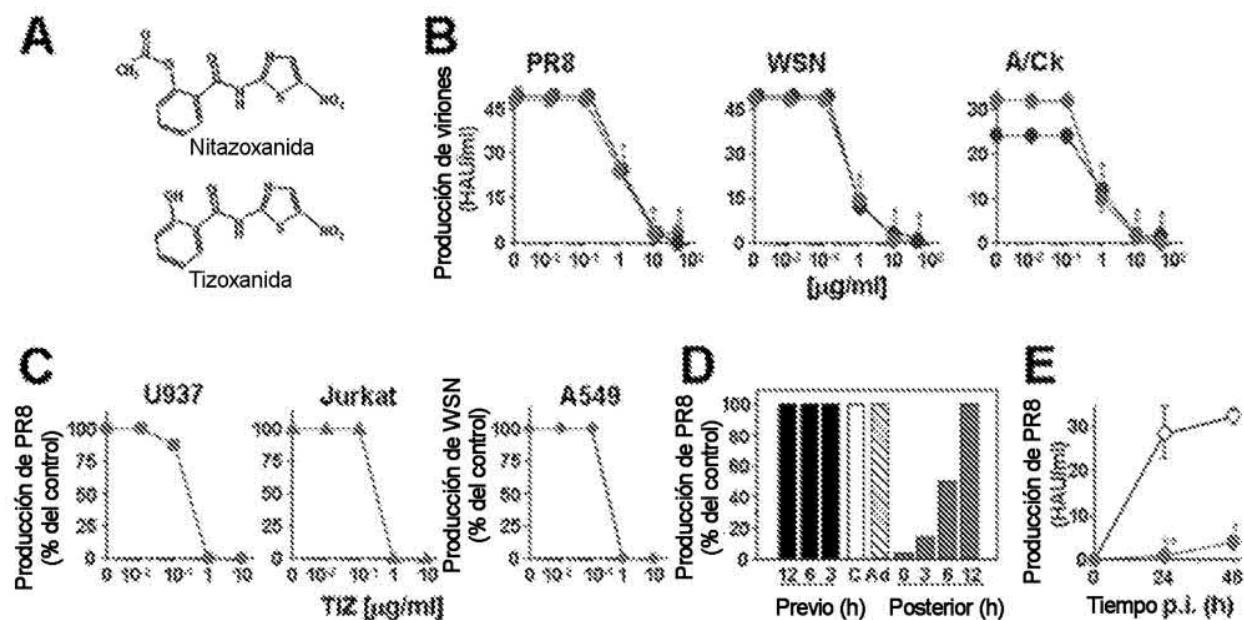


FIGURA 2

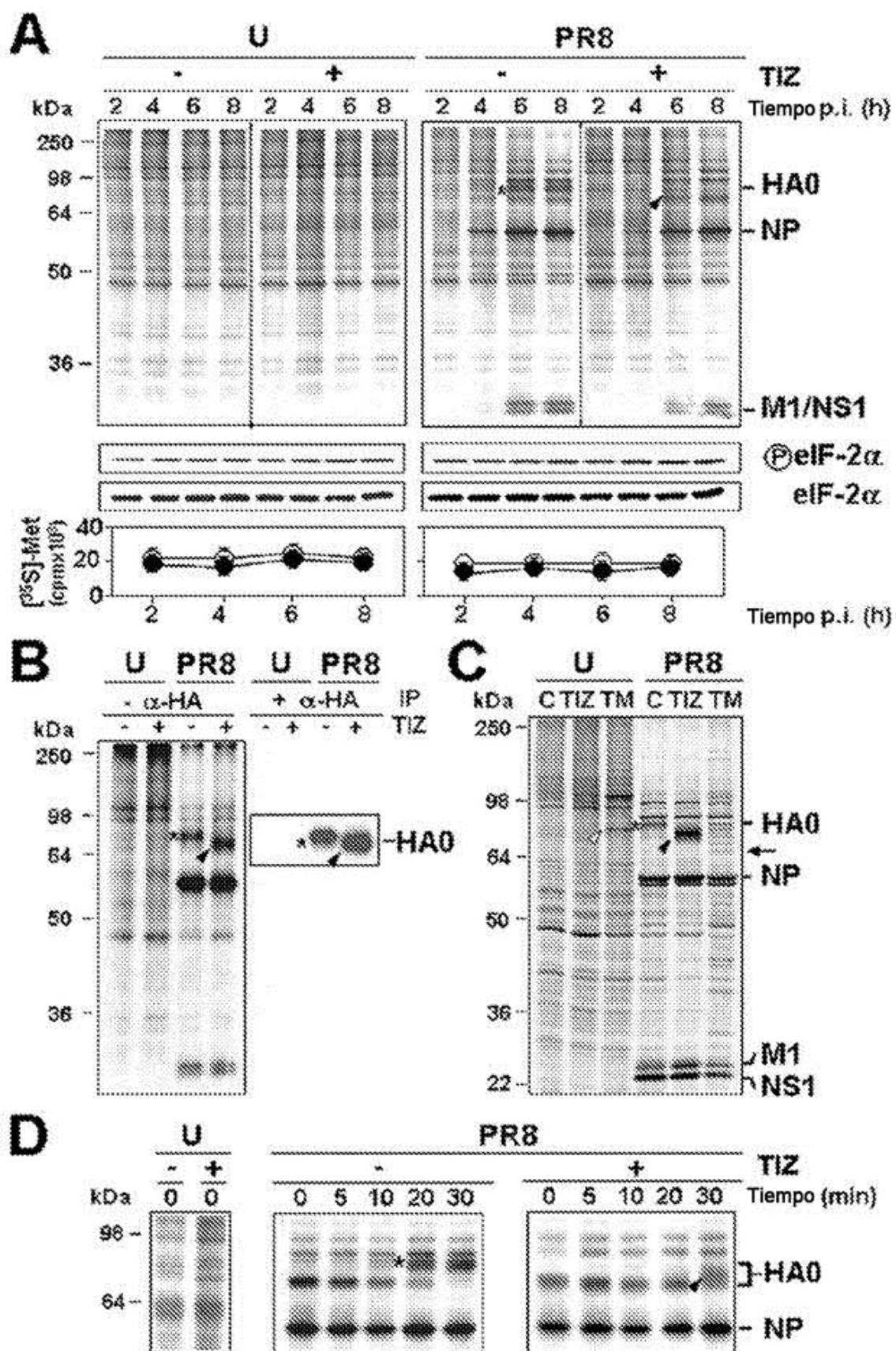


FIGURA 3

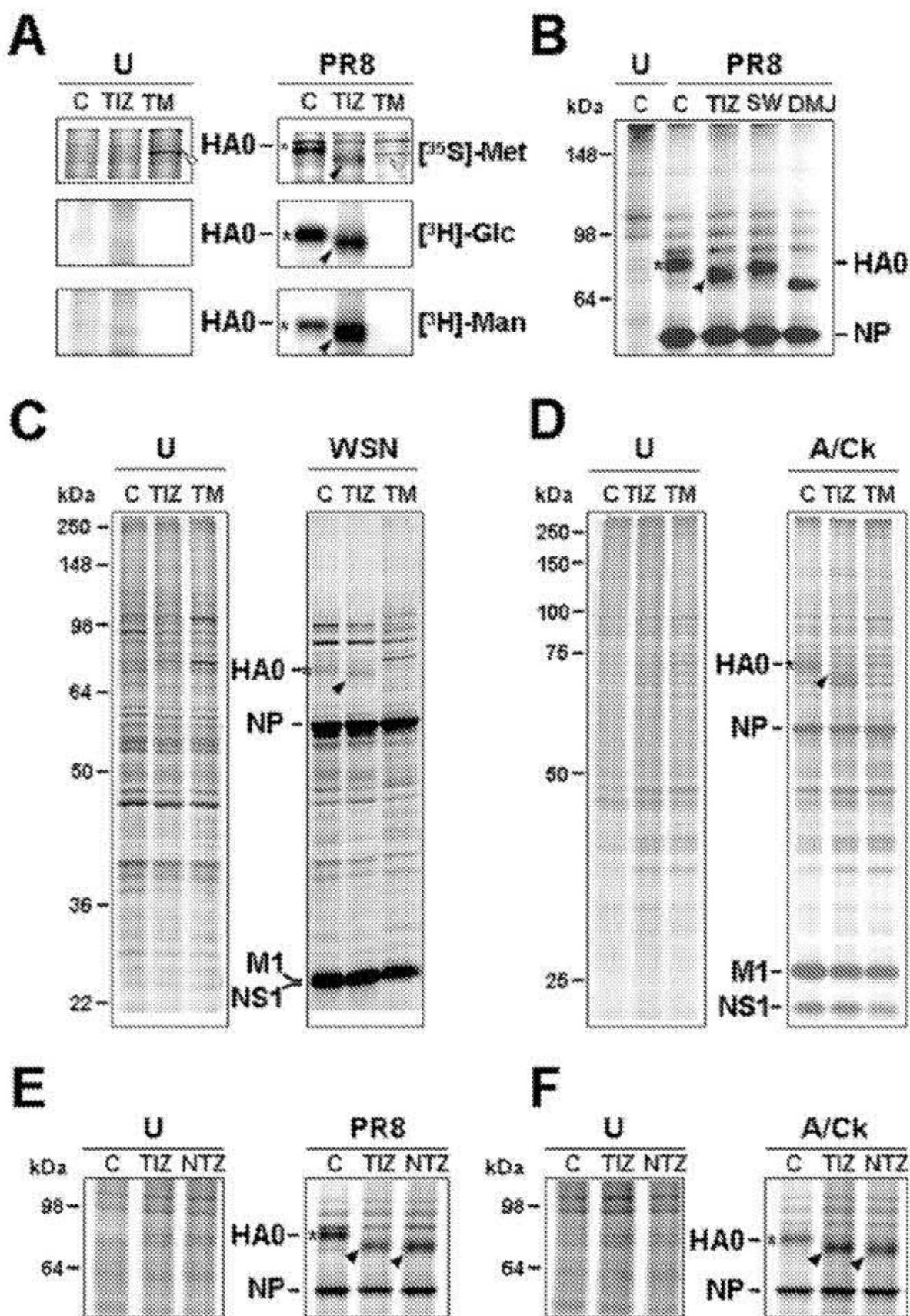


FIGURA 4

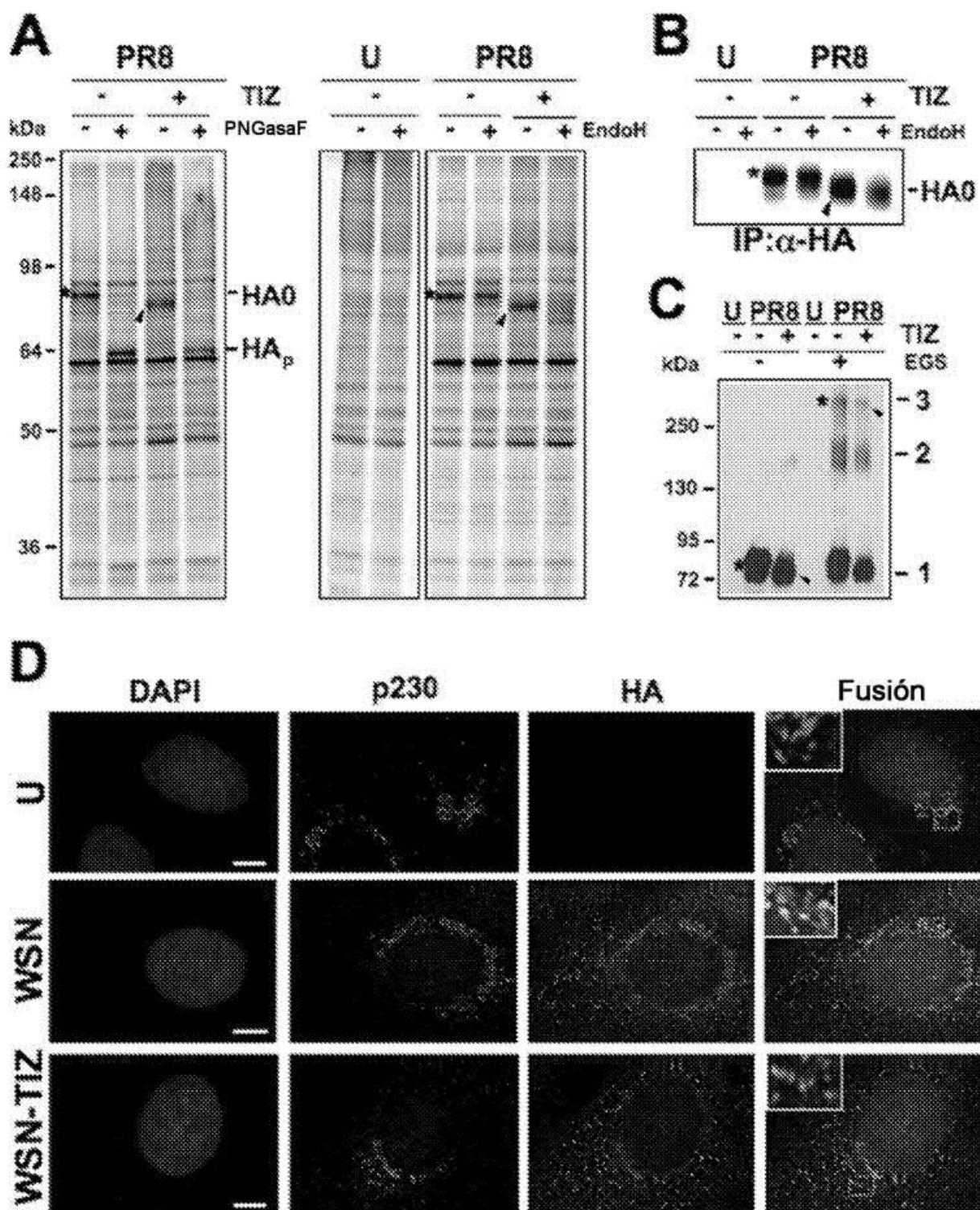


FIGURA 5

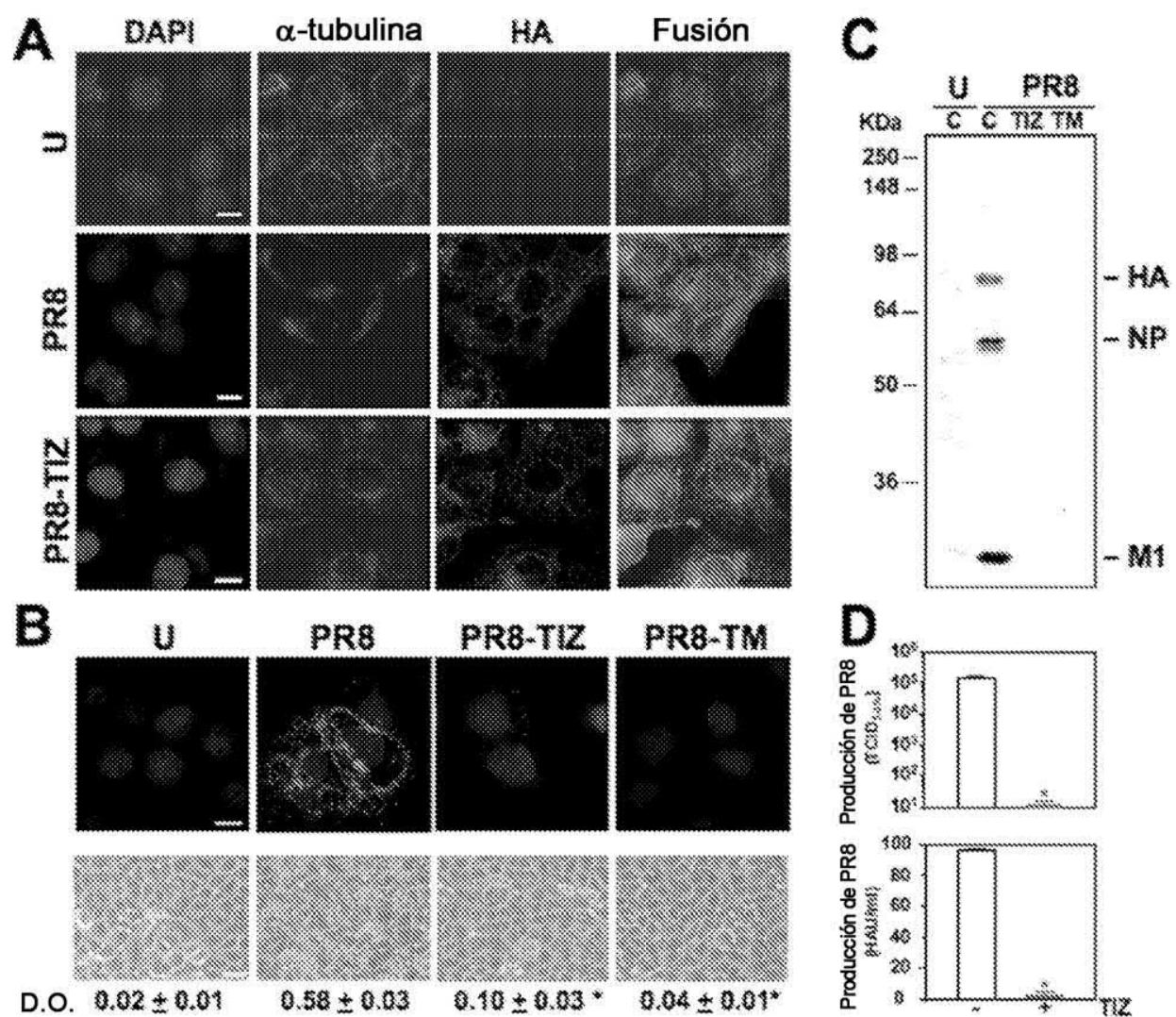


FIGURA 6

MDCK/PR8

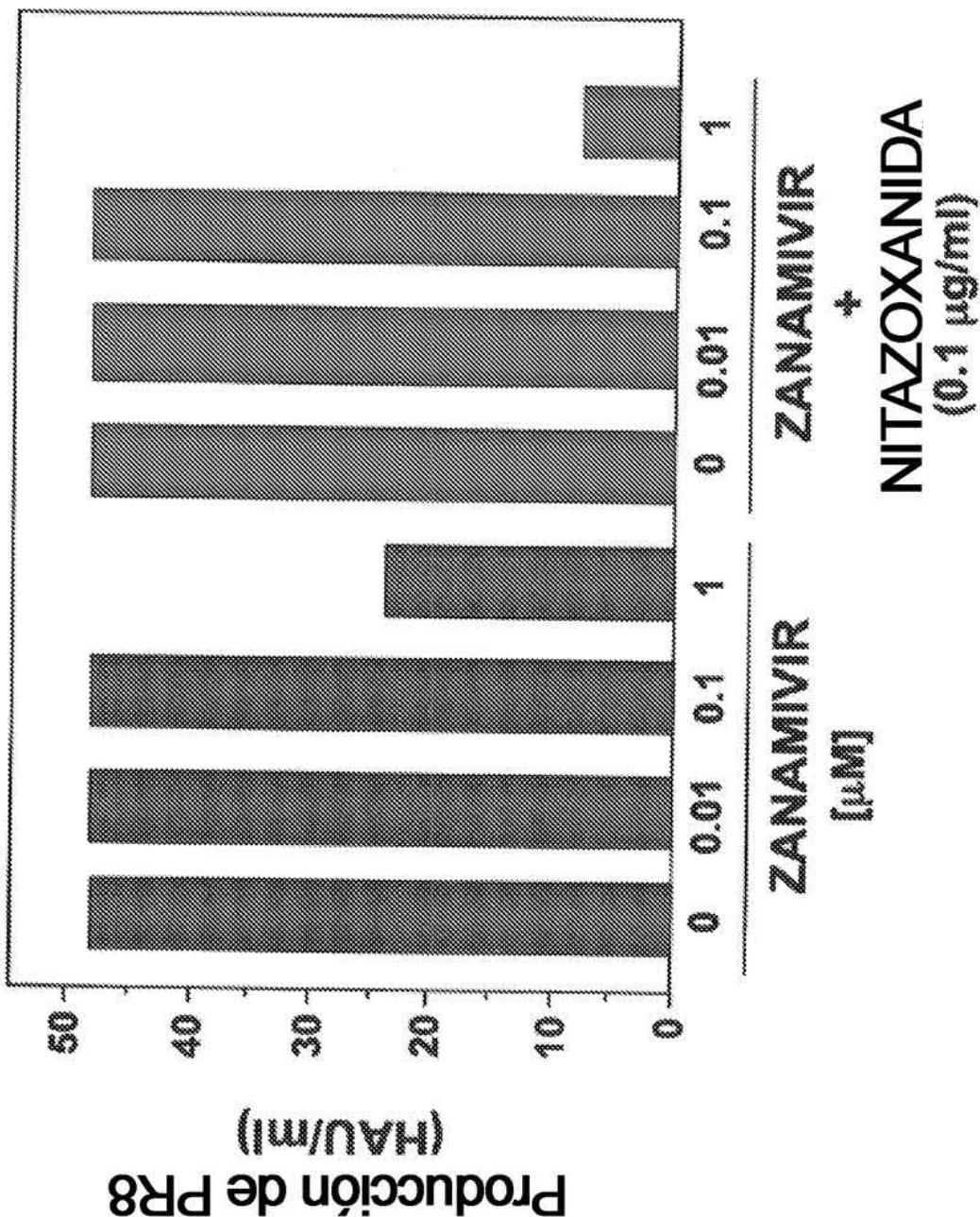


FIGURA 7

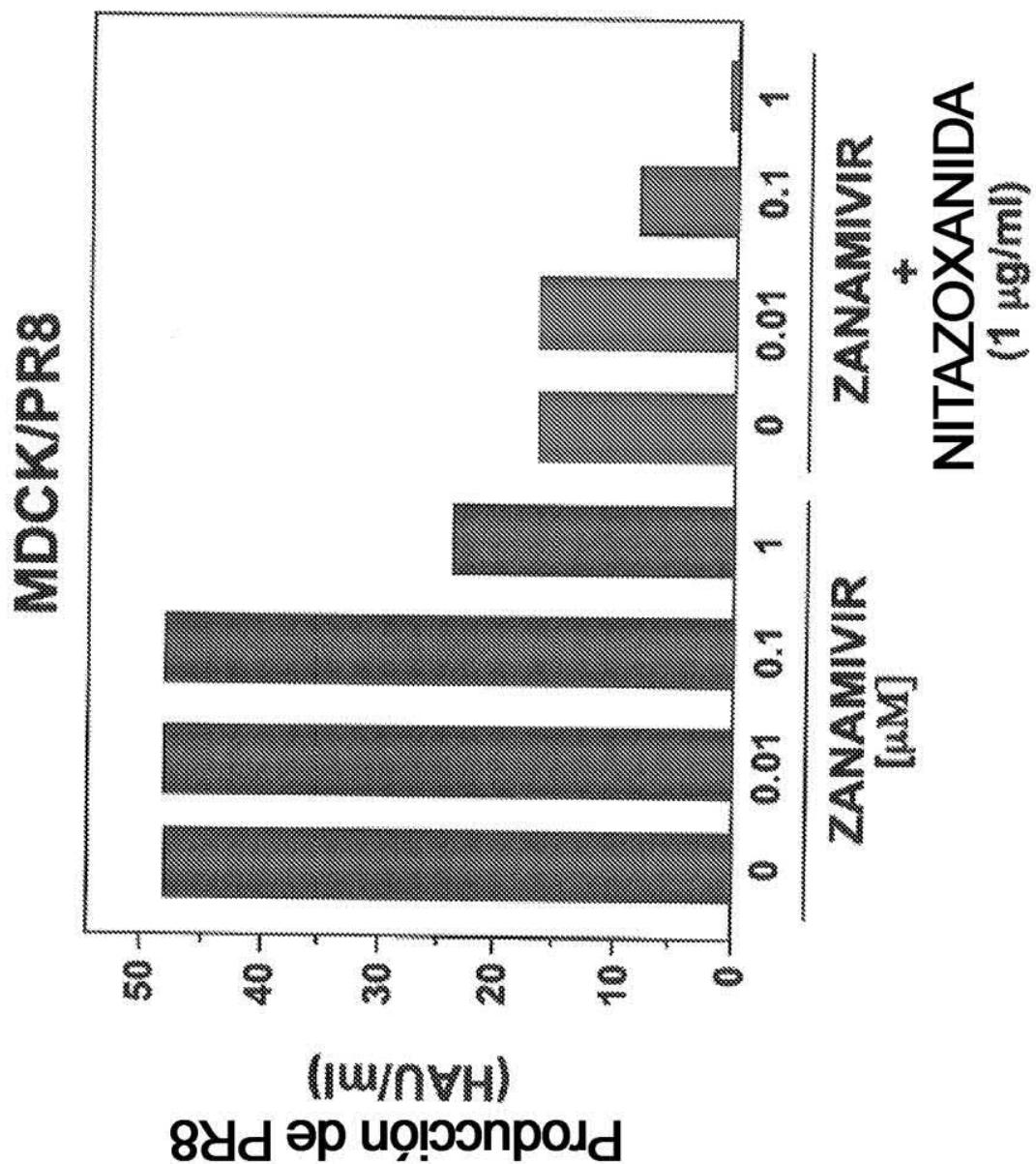


FIGURA 8

MDCK/PR8

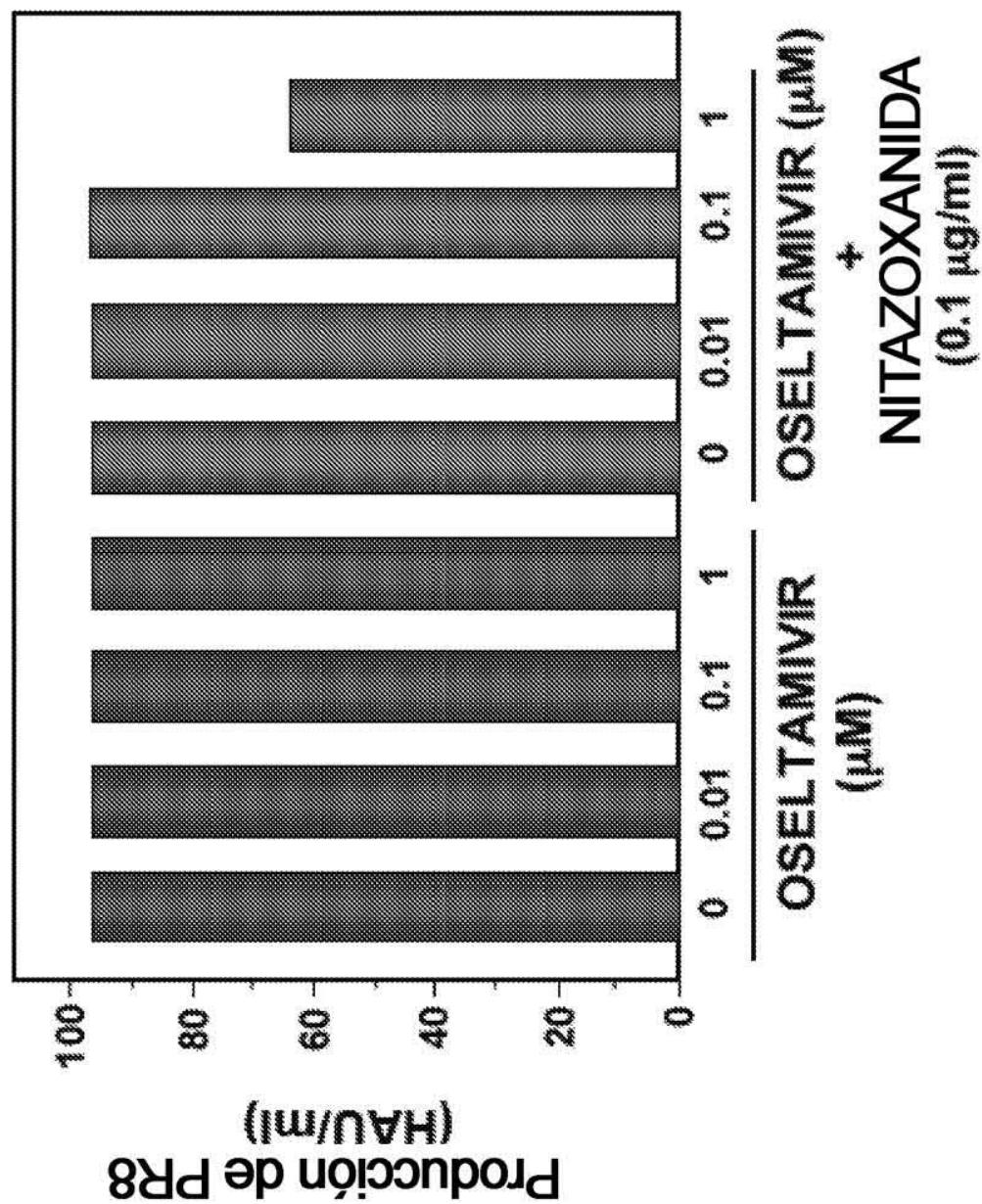


FIGURA 9

MDCK/PR8

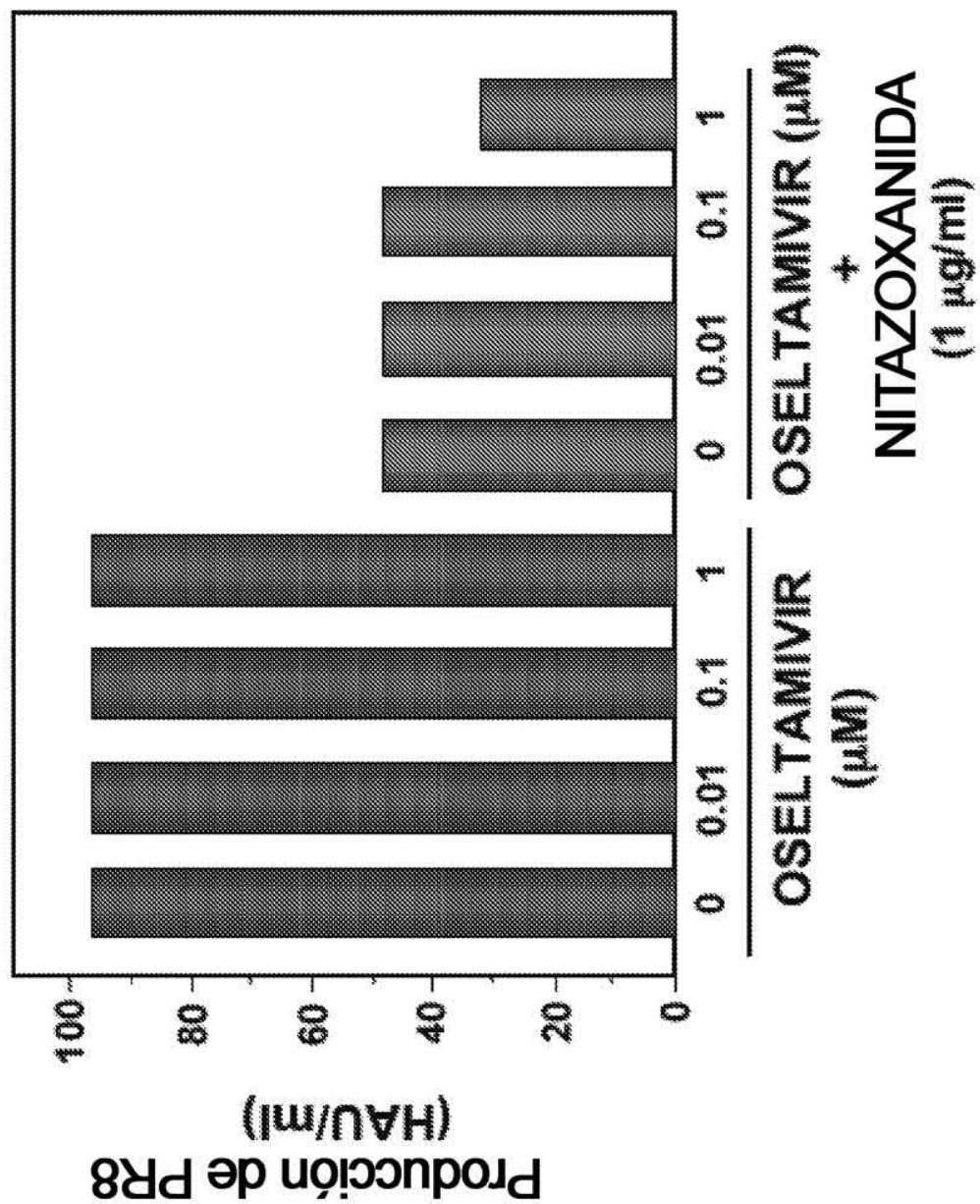


FIGURA 10

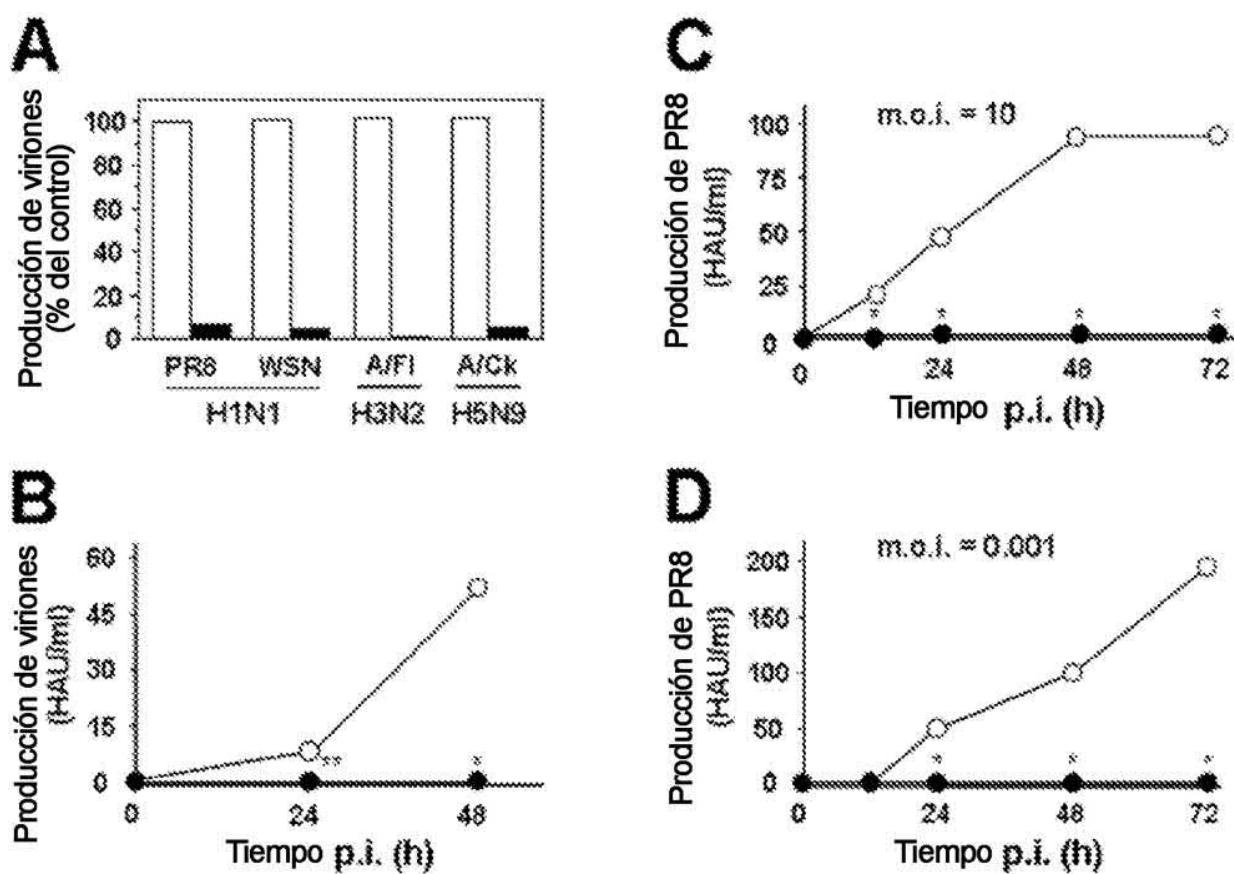
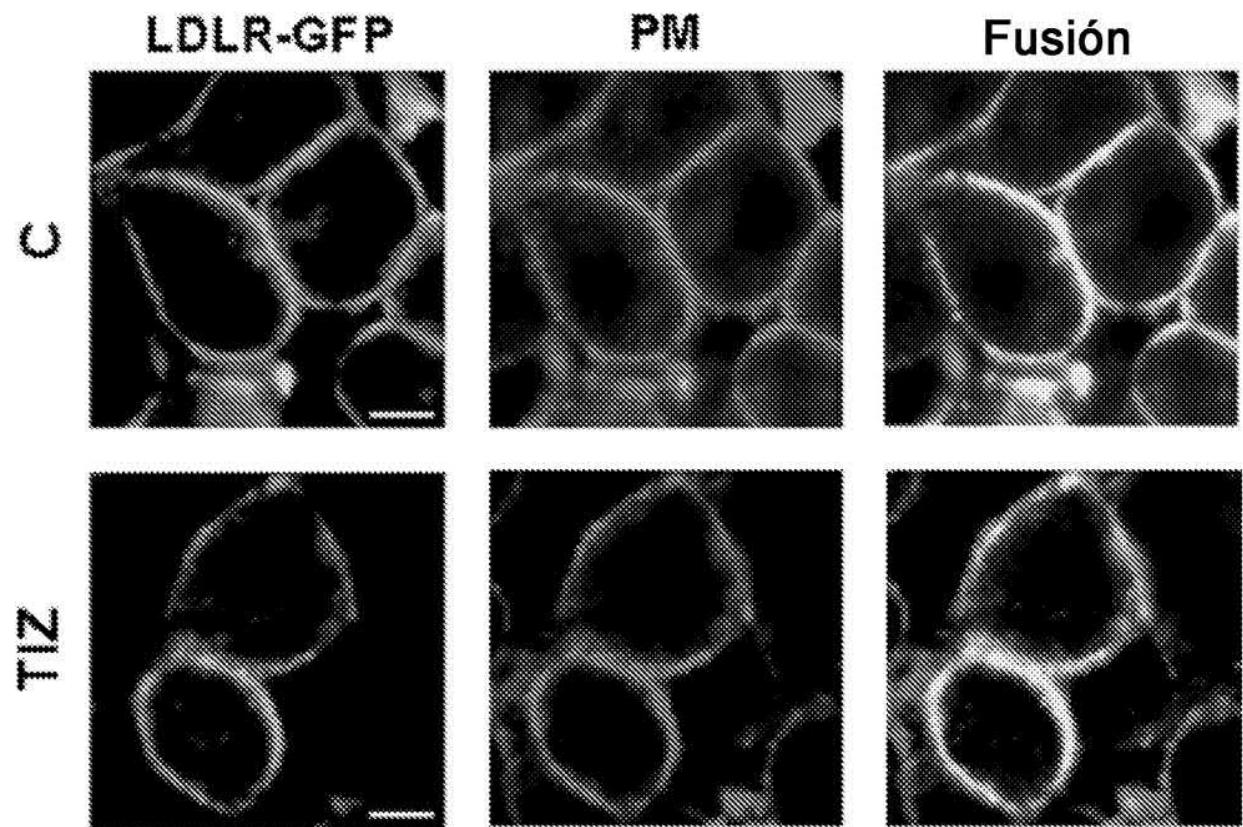


FIGURA 11



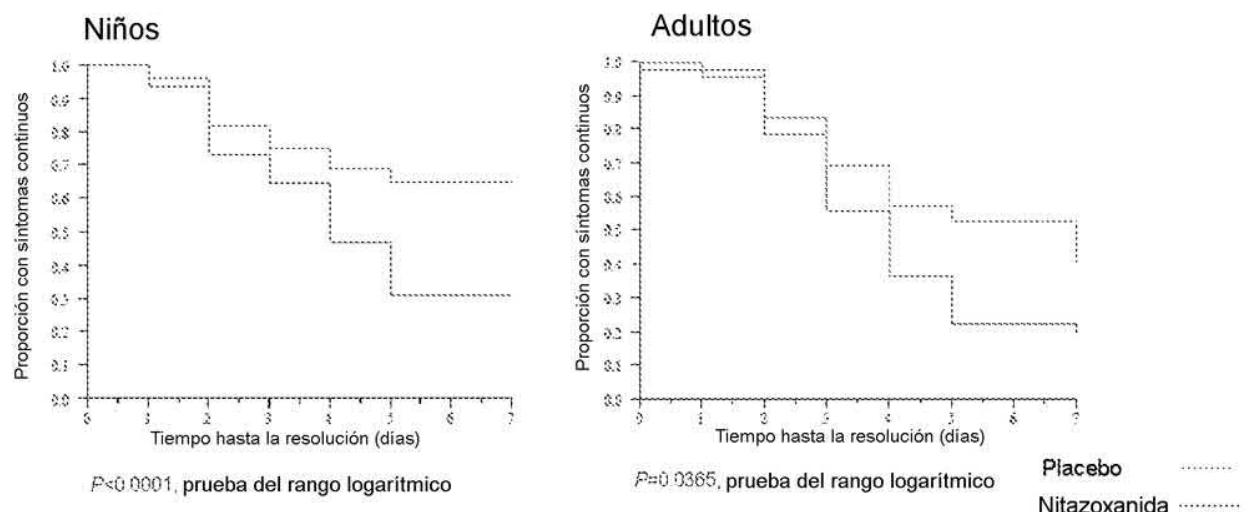
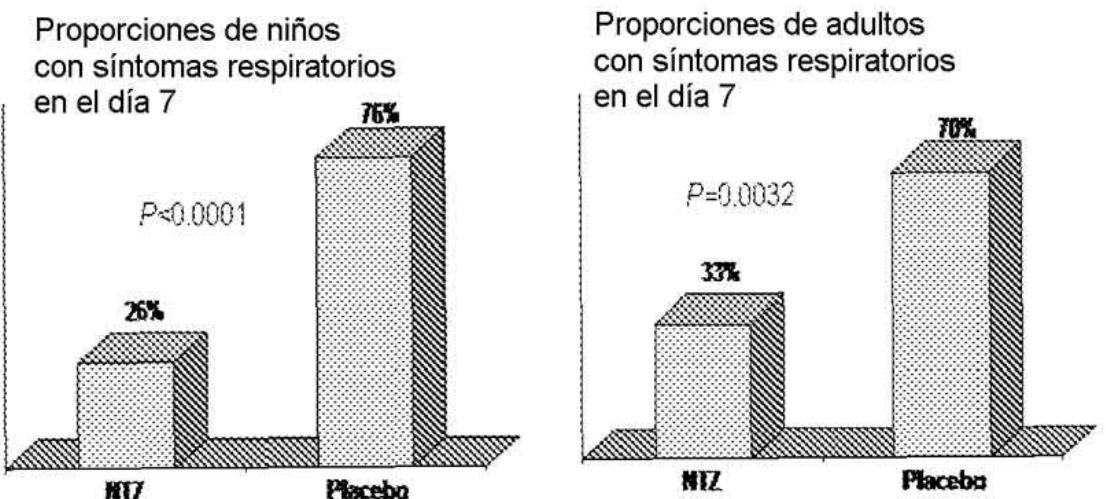


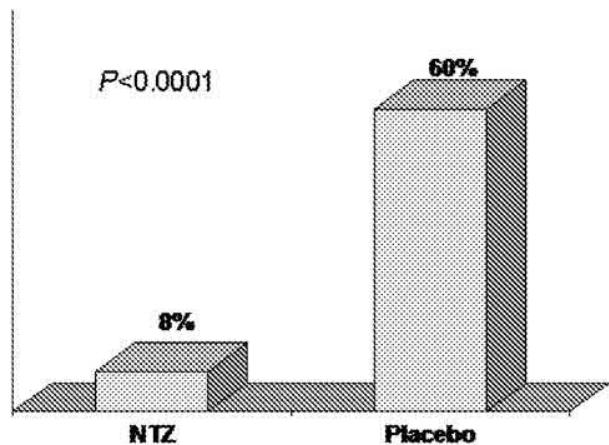
Figura 12



	Niños (<12 años)		Adultos (≥ 12 años)	
	NTZ	Placebo	NTZ	Placebo
Orofaringe eritematosa	18%	68%	23%	67%
Amígdalas hipertróficas	16%	70%	19%	49%
Congestión nasal	8%	46%	2%	5%
Estertores secos	6%	38%	7%	12%
Adenomegalia	6%	24%	5%	5%

Figura 13

Proporciones de niños recetados
Antibióticos posteriores al estudio



Proporciones de adultos recetados
Antibióticos posteriores al estudio

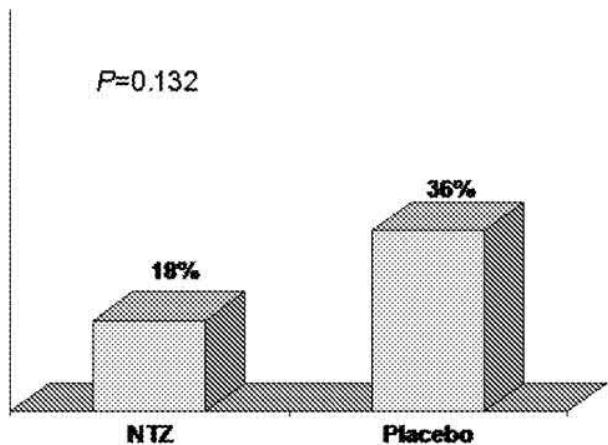


Figura 14

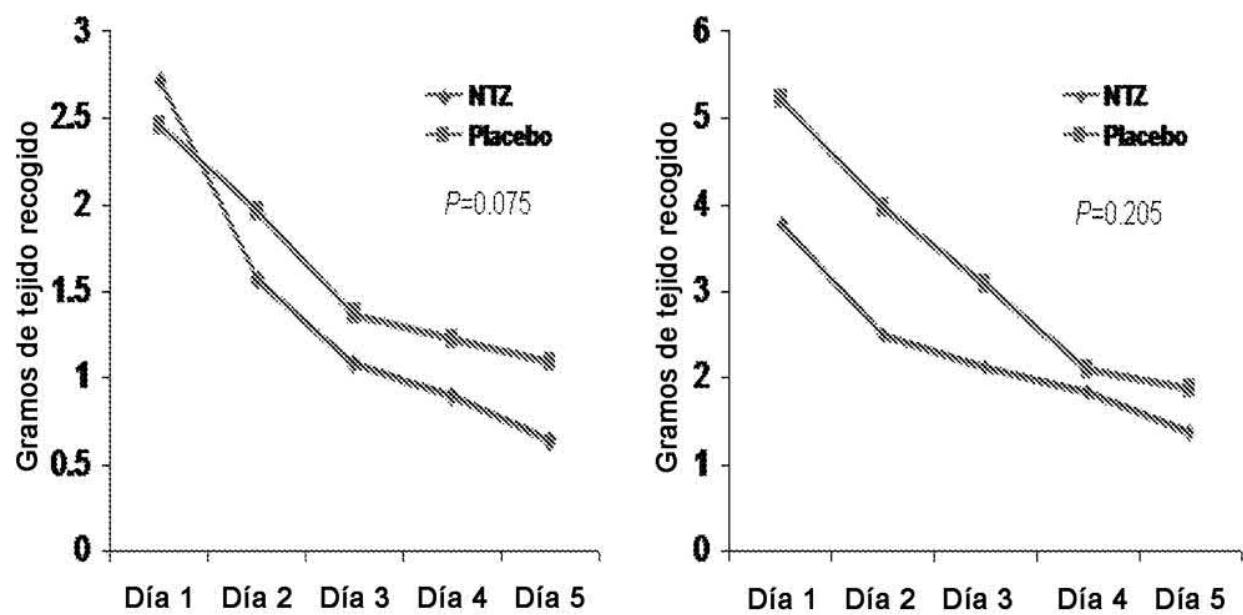


Figura 15