

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 500**

21 Número de solicitud: 202031082

51 Int. Cl.:

**A61K 31/365** (2006.01)

**A61K 36/19** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**29.10.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.04.2022**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**19.07.2022**

Fecha de concesión:

**15.03.2023**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**23.03.2023**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (35.0%)**

**C/ Serrano, nº 117**

**28006 Madrid (Madrid) ES;**

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**(25.0%);**

**UNIVERSIDAD DE NAVARRA (4.0%)y**

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN MÉDICA**

**APLICADA (36.0%)**

72 Inventor/es:

**RIVERO BUCETA, Eva María;**

**BOTELLA ASUNCIÓN, Pablo;**

**VIDAURRE AGUT, Carla;**

**BENLLOCH BAVIERA, José María;**

**NOVOA GARCÍA, Beatriz;**

**FIGUERAS HUERTA, Antonio;**

**GONZÁLEZ ASEGUINOLAZA, Gloria;**

**SMERDOU PICAZO, Cristian;**

**PINEDA LUCENA, Antonio A.;**

**PRÓSPER CARDOSO, Felipe Luis y**

**ARGEMÍ BALLBÉ, Josepmaría**

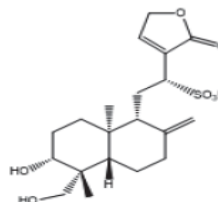
74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **DERIVADO DE ANDROGRAFÓLIDO PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DE  
ENFERMEDADES INFLAMATORIAS ASOCIADAS A UNA TORMENTA DE CITOQUINAS**

57 Resumen:

Derivado de andrografólido AG5 para su uso en el tratamiento de la reacción inflamatoria causada por una tormenta de citoquinas, particularmente producida por CoVID-19, bacterias con superantígenos o por terapias de células CAR-T, TIL o BiTE.



AG5

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 908 500 B2

## DESCRIPCIÓN

### **Derivado de andrografólido para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias asociadas a una tormenta de citoquinas**

5

La presente invención se refiere a un derivado de andrografólido (AG5) para su uso en el tratamiento de la reacción inflamatoria causada por una tormenta de citoquinas, particularmente producida por CoViD-19, bacterias con superantígenos o por terapias de células CAR-T, TIL o BiTE.

10

#### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

La rápida expansión de la pandemia mundial CoViD-19 ha supuesto una grave amenaza para los sistemas de salud de todos los países debido a su alta tasa de hospitalización y mortalidad. Un porcentaje importante de los enfermos de CoViD-19 fallecen a causa de la tormenta de citoquinas, generada por una respuesta inflamatoria exagerada del organismo humano, frente a una infección sobre la que no posee inmunidad previa. Por otro lado, muchos de los pacientes que sobreviven a la enfermedad después de su estancia de mayor o menor duración en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), quedan con secuelas pulmonares graves debido a la tormenta de citoquinas.

20

25

La industria farmacéutica ha desarrollado varios anticuerpos monoclonales dirigidos a inhibir citoquinas inflamatorias. Así, Tocilizumab (Roche), Sarilumab (Sanofi), Siltuximab (Eusa Pharma) son inhibidores de Interleucina-6 (IL-6); Anakinra (Amgen) es un inhibidor de Interleucina-1 (IL-1) y Canakinumab (Novartis) es un inhibidor de IL-1 $\beta$ . La IL-1beta IL-1 $\beta$  controla el inflamasoma y, por lo tanto, su inhibición resulta importante en el manejo de la inflamación.

30

Por otro lado, la industria farmacéutica ha desarrollado además fármacos capaces de inhibir vías moleculares intracelulares que tienen también un efecto en el control de la inflamación. Así, por ejemplo, Baricitinib (Olumiant) es un inhibidor de la vía JAK1/JAK2.

Muchos de los compuestos anteriores se han utilizado en ensayos clínicos durante la pandemia CoViD-19 para intentar reducir la respuesta inflamatoria frente al virus SARS-

CoV-2.

Sin embargo, dichos fármacos adolecen de varias limitaciones en la práctica: muchas veces los anticuerpos monoclonales presentan una toxicidad elevada que se refleja en la aparición de efectos secundarios importantes; inhiben solamente un componente de la inflamación sin abordar la tormenta de citoquinas en conjunto; se dirigen exclusivamente a inhibir la respuesta inflamatoria en lugar de modularla.

Desde hace siglos en el Ayurveda (medicina tradicional de la India) se utiliza el principio activo andrografólido, presente en la planta de origen en India *Andrographis paniculata*, para el tratamiento de enfermedades respiratorias agudas.

La industria farmacéutica china ha desarrollado en el pasado un fármaco inyectable denominado Xiyanning. Aunque en el artículo D. Zhang *et al.*, The clinical benefits of Chinese patent medicines against CoViD-19 based on current evidence, *Pharm. Res.* 157 (2020) 104882, se menciona que dicho fármaco consiste principalmente en sulfonato de andrografólido, aunque en realidad se trata de un preparado semisintético que contiene una mezcla de dos derivados de andrografólido, 9-dehidro-17-hidro-andrografólido, y 9-dehidro-17-hidro- andrografólido -19-il sulfato, derivados estructurales del andrografólido diferentes a los presentados en esta invención.

El Xiyanning también se ha utilizado como alternativa eficaz a los antibióticos en la práctica clínica (Q. Li, *et al.*, Xiyanning plus azithromycin chemotherapy in pediatric patients with *mycoplasma pneumoniae pneumonia*: a systematic review and meta-analysis of efficacy and safety, *Evid.-Based Compl. Alt.* 2019 (2019) 2346583).

El Xiyanning también resulta eficaz como antipirético y antiinflamatorio (Q.W. Yang, *et al.*, Crystal structure and anti-inflammatory and anaphylactic effects of andrographlide sulphonate E in Xiyanning, a traditional Chinese medicine injection, *J. Pharm. Pharmacol.* 71 (2) (2019) 251–259).

Igualmente, el Xiyanning mejora los síntomas respiratorios, inhibe las infecciones bacterianas oportunistas, y regula la función inmune, con menor riesgo clínico, especialmente mediante cierta protección hepática, sugiriendo que puede aliviar el daño producido en el hígado por ciertos fármacos durante el tratamiento del CoViD-19 en

casos agudos (N. Cai, *et al.*, Theoretical basis and effect characteristics of andrographolide against CoViD-19, *Chin. Tradit. Herb. Drugs* 51 (5) (2020) 1159–1166).

Además, se ha reportado la actividad del Xiyanping sobre la mejora en casos de sepsis  
5 en ratones mediante la supresión de las vías de señalización MAPK, STAT3 and NF-κB, que juegan un papel importante en las enfermedades pulmonares (W. Guo, *et al.*, Water-soluble andrographolide sulfonate exerts anti-sepsis action in mice through down-regulating p38 MAPK, STAT3 and NF-κB pathways, *Int. Immunopharmacol.* 14 (4) (2012) 613–619).

10

Por otro lado, se ha estudiado la posibilidad de utilizar el andrografólido y otros compuestos fitoquímicos naturalmente presentes en *Andrographis paniculata* como antivirales mediante métodos computacionales. Así, muy recientemente se ha explorado la interacción del andrografólido mediante modelización computacional del  
15 acoplamiento molecular (*docking*) con componentes específicos del SARS-CoV-2 para el tratamiento del síndrome respiratorio agudo asociado a la CoViD-19. En este contexto, S. Alagu Lakshmi *et al.*, Ethnomedicines of Indian origin for combating CoViD-19 infection by hampering the viral replication: using structure-based drug discovery approach. *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2020), doi: 10.1080/07391102.2020.1778537) indican  
20 la afinidad del bis-andrografólido por la proteasa principal 3CLpro del SARS-CoV-2, lo que potencialmente le permitiría inhibir esta enzima.

La afinidad andrografólido-proteasa principal 3CLpro del SARS-CoV-2 es igualmente descrita por S.K. Enmozhi *et al.*, Andrographolide as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: an *in silico* approach, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2020), doi: 10.1080/07391102.2020.1760136).

Por su parte, D. Sivaraman and P.S. Pradeep, Scope of phytotherapeutics in targeting ACE2 mediated host-viral interface of SARS-CoV2 that causes CoViD-19, doi: 10.26434/chemrxiv.12089730.v1) describen el bloqueo del receptor celular ACE2 por  
30 andrografólido.

Asimismo, usando métodos computacionales de *docking* y de dinámica molecular, se ha valorado la utilización del andrografólido y tres derivados estructurales (14-deoxi-  
35 11,12-didehidro andrografólido, neoandrografólido y 14-deoxi andrografólido) frente a

cuatro dianas del virus SARS-CoV-2, incluyendo tres proteínas no estructurales (proteasa principal 3CLpro, PLpro y polimerasa RNA dirigida a RNA RdRp) y una proteína estructural (*spike protein* (S)), que son responsables de la replicación, transcripción e internalización celular del virus, seleccionando al neoandrografólido como el mejor inhibidor (N.A. Murugan *et al.*, Computational investigation on *Andrographis paniculata* phytochemicals to evaluate their potency against SARS-CoV-2 in comparison to known antiviral compounds in drug trials, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2020), doi: 10.1080/07391102.2020.1777901).

Finalmente, en un estudio por *docking* sobre 27 metabolitos de origen vegetal, analizando el acoplamiento de los mismos con diversas dianas del virus (proteasa principal, proteína Nsp9, dominio del receptor *spike*, ectodominio del receptor *spike* y dominio HR2), no se seleccionó al andrografólido como significativo frente al SARS-CoV-2 comparado con otros compuestos (K.F. Azim *et al.*, Screening and druggability analysis of some plant metabolites against SARS-CoV-2: An integrative computational approach, *Informatics in Medicine Unlocked* 20 (2020) 100367).

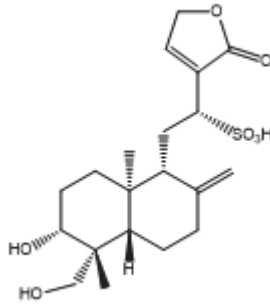
Además, se ha testado el andrografólido como antiviral en un dispositivo *microarray* que contenían algunos de las proteínas principales del virus SARS-CoV-2, obteniendo resultados positivos (P. Chen *et al.*, Establishment and validation of a drug-target microarray for SARS-CoV-2, doi: 10.1080/07391102.2020.1777901).

Por otro lado, se ha sugerido la utilización del andrografólido en combinación con melatonina como tratamiento potencialmente eficaz contra CoViD-19. (A. Banerjee *et al.*, Crosstalk between endoplasmic reticulum stress and anti-viral activities: A novel therapeutic target for CoViD-19, *Life Sciences* 255 (2020) 117842)

Por todo ello, resulta crítico desarrollar nuevos fármacos que controlen la respuesta inflamatoria en todas sus vertientes, que presenten una baja toxicidad y que además tenga una alta biodisponibilidad en el tracto respiratorio.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al compuesto AG5:



AG5,

para su uso en el tratamiento de una patología en la que se produce una reacción inflamatoria asociada a una tormenta de citoquinas.

5

La presente invención también se refiere a las sales y los solvatos de compuesto AG5.

El compuesto AG5 posee centros quirales, los cuales pueden dar lugar a diversos estereoisómeros. La presente invención se refiere a cada uno de los estereoisómeros individuales, así como a sus mezclas.

10

A lo largo de la descripción, el término “tormenta de citoquinas” se refiere a la liberación masiva de sustancias mediadoras de la inflamación, especialmente citoquinas, como consecuencia de una disrupción en el sistema inmune producida por una infección o por inmunoterapia. Esta tormenta de citoquinas puede estar causada, entre otros, por una infección vírica, como la enfermedad CoViD-19, una infección bacteriana, particularmente por bacterias con superantígenos tales como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, o por inmunoterapia, como inmunoterapia por células CAR-T empleada en tratamientos de cáncer, inmunoterapia por linfocitos tumorales (TIL) o por anticuerpos biespecíficos (BiTE). Así, ejemplos de manifestaciones clínicas consecuencia de la tormenta de citoquinas incluyen, entre otros, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y el síndrome de disfunción multiorgánica, que conllevan, entre otros síntomas, shock, fiebre, erupciones, descamación de palmas y plantas, hipotensión, diarrea, vómitos, mialgia severa, disfunción renal, problemas hepáticos, insuficiencia respiratoria, hemorragia incontrolada y desorientación.

15

20

25

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto AG5 para el uso definido anteriormente, donde la tormenta de citoquinas está causada por infección vírica,

infección bacteriana o inmunoterapia.

En otra realización la invención se refiere al compuesto AG5 para el uso definido anteriormente, donde la infección vírica es CoViD-19.

5

En otra realización la invención se refiere al compuesto AG5 para el uso definido anteriormente, donde la infección bacteriana es por bacterias con superantígenos, y preferiblemente donde la infección bacteriana es por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

10

En otra realización la invención se refiere al compuesto AG5 para el uso definido anteriormente, donde la inmunoterapia se lleva a cabo por células CAR-T, por linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) o por anticuerpos biespecíficos (BiTE), y preferiblemente donde la inmunoterapia se lleva a cabo por células CAR-T.

15

En otra realización la invención se refiere al compuesto AG5 para el uso definido anteriormente, caracterizado porque se puede administrar por vía parenteral o por vía oral.

20

En otra realización la invención se refiere al compuesto AG5 para el uso definido anteriormente, caracterizado porque se administra a una concentración de entre 0,0001 mg/(kg h) y 10 mg/(kg h) durante un tiempo de entre 1 h a 2000 h, y preferiblemente a una concentración de entre 0,01 mg/(Kg h) y 0,25 mg/(Kg h) durante un tiempo de entre 24 h y 480 h.

25

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **FIG. 1** muestra la actividad antiinflamatoria del andrografólido (**AG1**), el extracto original

de *Andrographis paniculata* (EAp), y sus derivados estructurales (tratamiento por microinyección) medida en función del recuento de células implicadas en la respuesta inflamatoria en larvas de *Danio rerio* tras la infección por microinyección de SVCV (simultánea a la administración de fármacos), respecto de los grupos control que no  
 5 recibieron tratamiento. Ctr MEM: control que recibió una inyección de MEM. Ctr: control que recibió una inyección de SVCV. \*=diferencias estadísticas con respecto al grupo control infectado. hpi: horas post inyección.

**FIG. 2** muestra micrografías de fluorescencia de larvas transgénicas de *Danio rerio* (LYZ:Red) que presentan neutrófilos fluorescentes tras infección por microinyección de SVCV y tratamiento simultáneo con andrografólido (**AG1**), el extracto original de *Andrographis paniculata* (EAp) y sus derivados estructurales. Ctr MEM: control que recibió una inyección de MEM. SVCV: control que recibió una inyección de SVCV.  
 10

**FIG. 3** muestra la actividad antiinflamatoria del andrografólido (**AG1**), el extracto original de *Andrographis paniculata* (EAp) y sus derivados estructurales (tratamiento por baño) medida en función del recuento de neutrófilos migrantes ante un estímulo inflamatorio agudo (corte de cola) en larvas de *Danio rerio*, con respecto a un grupo control que no recibió tratamiento. \*=diferencias estadísticas con respecto al grupo control.  
 15

**FIG. 4** muestra la actividad antiinflamatoria del andrografólido (**AG1**), el extracto original de *Andrographis paniculata* (EAp) y sus derivados estructurales (tratamiento en baño) medida en función de la expresión génica de citoquina IL-6 en larvas de *Danio rerio* tras la infección por microinyección de SVCV, respecto del grupo control. Ctr MEM: control que recibió una inyección de MEM. Ctr: control que recibió una inyección de SVCV.  
 20  
 25 \*=diferencias estadísticas con respecto al grupo control infectado.

## EJEMPLOS

30 A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad y ausencia de toxicidad del producto de la invención.

**EJEMPLO 1:** Obtención de andrografólido (3-[2-[decahidro-6-hidroxi-5-(hidroxi-metil)-5,8a-dimetil-2-metileno-1-naftalenil]etilideno]dihidro-4-hidroxi-2(3H)-furanona) a partir  
 35

*del extracto de Andrographis paniculata*

Se suspende 5 g del extracto crudo de *A. paniculata* en 50 ml de agua Milli-Q® en un embudo de separación. Se añade 500 ml de hexano, se agita la mezcla vigorosamente y se deja decantar durante 1 hora. Se separa la fase orgánica y se repite el proceso dos veces, descartando las fracciones de n-hexano. A continuación, se añade 500 ml de cloroformo. La mezcla se agita vigorosamente y se deja decantar durante 1 hora. Se separa la fase orgánica cuidadosamente y se repite el proceso dos veces, juntando todas las fracciones de cloroformo. El disolvente se elimina bajo presión reducida y el aceite obtenido se diluye con 200 ml de metanol. Esta disolución se calienta hasta ebullición, se filtra y se introduce en baño de hielo durante 1 h. A continuación, la disolución fría se guarda en nevera a 4 °C hasta evaporación casi completa del disolvente. Los cristales incoloros de andrografólido se lavan con metanol frío y se secan a temperatura ambiente. Se obtiene un rendimiento del 3% en andrografólido (compuesto **AG1**) de pureza superior al 99%.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) 6,62 (t, *J* = 6,4 Hz, 1H); 5,67 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H); 5,01 (s, 1H); 4,91 (s, 1H), 4,81 (s, 1H); 4,62 (s, 1H); 4,39 (dd, *J* = 8,7, 6,4 Hz, 1H); 4,11 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H); 4,03 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H); 3,85 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H); 3,28 – 3,14 (m, 2H); 2,45 (s, 1H); 2,32 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H); 2,03 – 1,82 (m, 2H); 1,70 (dd, *J* = 29,9, 14,3 Hz, 4H); 1,35 (dd, *J* = 23,1, 12,7 Hz, 1H); 1,20 (d, *J* = 11,8 Hz, 2H), 1,09 (s, 3H); 0,66 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) δ 169,89; 147,57; 146,22; 128,95; 108,18; 78,43; 74,27; 64,50; 62,61; 55,47; 54,37; 42,26; 38,56; 37,48; 36,50; 27,87; 23,93; 23,03; 14,71.  
HR-MS (ESI, m/z) [M+H]<sup>+</sup> calculada para C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>5</sub> 351,4628; encontrada 351,4633.

**EJEMPLO 2:** *Síntesis de 14-deoxi-12(R)-sulfo-andrografólido*

1,0 g de andrografólido (**AG1**, 2,9 mmol) se disuelven en 15 ml de etanol al 95%, calentando dicha disolución a 50 °C (disolución 1). A 4 ml de disolución de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1M, se añaden 4,8 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 2% (M/M) y 8 ml de agua (disolución 2). La disolución 1 se añade sobre la disolución 2 y la mezcla de reacción se mantiene en agitación a reflujo durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, se ajusta el pH de la reacción a pH 6 ~7 añadiendo disolución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 2% y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo se disuelve en agua (20 ml) y se extrae con cloroformo

(20 ml x 3). Se evapora el disolvente de la fase orgánica bajo presión reducida. El residuo de la fase acuosa se disuelve en metanol (10 ml) y se filtra. En la fracción que contiene el producto se evapora el disolvente a presión reducida y se obtienen 0,6 g del compuesto **AG5** (51 %).

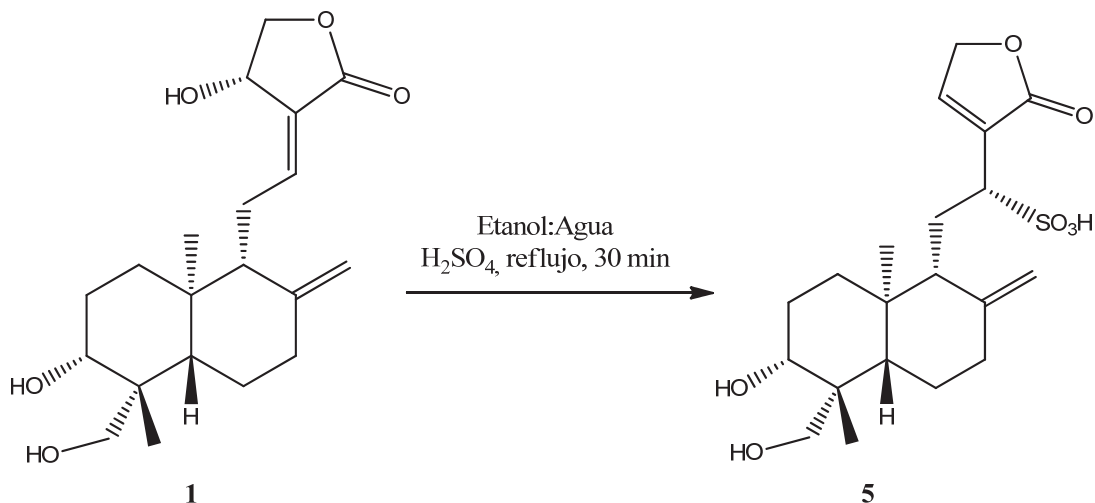
5

$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7,65 ppm (t,  $J = 1,8$  Hz, 1H); 4,95 (o, 2H); 4,87 (o, 2H); 4,66 ( $s_a$ , 1H); 4,16 (dd,  $J = 10,2$  y  $6,1$  Hz, 1H); 4,05 (d,  $J = 11,4$  Hz, 1H); 3,92 (dd,  $J = 12,2$  y  $1,8$  Hz, 1H); 3,30 (t,  $J = 9,8$  Hz, 1H); 3,27 (d,  $J = 11,4$  Hz, 1H); 2,36 (m, H); 2,31 (dd,  $J = 12,6$  y  $11,4$  Hz, 1H); 2,08 (t,  $J = 12,6$  Hz, 1H); 1,86 (m, H); 1,83 (m, H); 1,80 (m, H);  
 10 1,71 (m, 2H); 1,38 ( $d_a$ ,  $J = 11,8$  Hz, 1H); 1,28 (qd,  $J = 12,6$  y  $4,2$  Hz, 1H); 1,12 (s, 3H); 1,10 (dd,  $J = 12,6$  y  $2,4$  Hz, 1H); 1,02 (m, H); 0,68 (s, 3H);

$^{13}\text{C-RMN}$  (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 177,2; 152,1; 149,1; 132,5; 109,2; 81,7; 73,3; 65,8; 57,2; 56,8; 55,3; 44,5; 40,8; 40,1; 38,9; 29,8; 28,0; 26,1; 24,2; 16,4.

15

HR-MS (ESI, m/z)  $[\text{M-H}]^-$  calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}_7\text{S}$ , 413,1639; encontrada 413,1634.



**EJEMPLO 3:** Validación de la actividad antiinflamatoria del andrografólido y sus  
 20 derivados en larvas de pez cebra (*Danio rerio*)

Los estudios de actividad antiinflamatoria de los compuestos se realizaron en peces de la línea salvaje (*wild type*), determinando los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6. También se emplearon larvas transgénicas con neutrófilos  
 25 fluorescentes (Tg(Mpx:GFP) $i114$ ) o células mieloides fluorescentes (Tg(LYZ:Red))

marcadas para evaluar cómo afectan los distintos tratamientos a la respuesta inflamatoria de estas células. El estímulo inflamatorio empleado fue tanto el propio virus que produce una activación del inflamasoma y muerte de macrófagos por piroptosis (Varela *et al. J. Virol.* 2016, 88, 12026), como un estímulo agudo de inflamación  
5 generado por una herida en la cola. La migración de los leucocitos fluorescentes de estas líneas transgénicas se estudió mediante microscopía y análisis de imagen.

En un primer ensayo se cuantificó la respuesta celular a la inflamación en larvas transgénicas de *Danio rerio* (LYZ:Red) después de una infección con SVCV tratadas o  
10 no (control) con los compuestos **AG1** (28  $\mu$ M), **AG3** (10  $\mu$ M), **AG4** (10  $\mu$ M), **AG5** (10  $\mu$ M) y EAp (10  $\mu$ g/ml). Los tratamientos se realizaron mediante micro-inyección (2 nl en ducto de Cuvier) de los fármacos sobre peces de 3 días post fertilización (5-10 peces/pocillo) administrándose de forma simultánea el virus y los distintos compuestos. El experimento se llevó a cabo analizando las células de cada pez de forma individual empleando 8  
15 réplicas por tratamiento ( $n = 8$ ). A las 2 h post inyección (2 hpi) se determinó el número de células implicadas en la respuesta inflamatoria. En la Figura 1 se observa que los compuestos **AG1**, **AG3**, **AG4** y **AG5** reducen significativamente la respuesta inflamatoria celular inducida por la infección viral con respecto a los grupos control. En la Figura 2 se muestran imágenes representativas de peces con cada uno de los  
20 tratamientos.

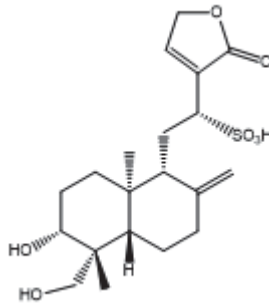
En un segundo ensayo, se analizó el efecto de los distintos compuestos en una respuesta inflamatoria aguda producida por una herida. Para ello, se emplearon peces transgénicos con neutrófilos fluorescentes (Tg(Mpx:GFP)<sup>i114</sup>) en los que se analizó su  
25 migración a la zona afectada. Los compuestos **AG1** (5  $\mu$ M), **AG3** (5  $\mu$ M), **AG4** (10  $\mu$ M), **AG5** (10  $\mu$ M) y EAp (10  $\mu$ g/ml) se administraron por baño y a las 24 horas se realizó la herida mediante el corte de la zona final de la cola. A las 24 horas, se realizó un recuento de los neutrófilos que migraron a la zona de la herida. Se observó que los compuestos AG4 y AG5 disminuían de forma significativa la respuesta inflamatoria generada por la  
30 migración de los neutrófilos a la herida contribuyendo a la resolución de la inflamación. Figura 3.

En un tercer y último ensayo, se determinó la expresión génica de citoquinas proinflamatorias en larvas de *Danio rerio* (*wild type*) tratadas con los compuestos **AG1**

(5  $\mu$ M), **AG3** (5  $\mu$ M), **AG4** (10  $\mu$ M), **AG5** (10  $\mu$ M) y EAp (10  $\mu$ g/ml), y posteriormente infectadas con SVCV. Los tratamientos se realizaron en baño durante 24 h sobre peces de 1 día post fertilización (10 peces/pocillo). El experimento se llevó a cabo por cuadruplicado ( $n = 4$ ). Al segundo día post fertilización se inyectó a cada pez (2 nl en ducto de Cuvier)  $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml de SVCV. A las 24 h se determinó la expresión de IL-6 mediante qPCR. Los resultados obtenidos en la Figura 4 indican que los compuestos **AG4** y **AG5** reducen significativamente la producción de IL-6 en la infección por SVCV con respecto a los grupos control no tratados.

**REIVINDICACIONES**

1. El compuesto AG5:



5

AG5

para su uso en el tratamiento de una patología en la que se produce una reacción inflamatoria asociada a una tormenta de citoquinas.

2. El compuesto AG5 para el uso según la reivindicación 1, donde la tormenta de  
10 citoquinas está causada por infección vírica, infección bacteriana o inmunoterapia.
3. El compuesto AG5 para el uso según la reivindicación 2, donde la infección vírica es  
CoViD-19.
- 15 4. El compuesto AG5 para el uso según la reivindicación 2, donde la infección  
bacteriana es por bacterias con superantígenos.
5. El compuesto AG5 para el uso según la reivindicación 2, donde la inmunoterapia se  
lleva a cabo por células CAR-T, por linfocitos infiltrantes tumorales (TIL) o por  
20 anticuerpos biespecíficos (BiTE).
6. El compuesto AG5 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,  
caracterizado porque se puede administrar por vía parenteral o por vía oral.
- 25 7. El compuesto AG5 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde  
el compuesto de fórmula I se administra a una concentración de entre 0,0001 mg/(kg  
h) y 10 mg/(kg h) durante un tiempo de entre 1 h a 2000 h.

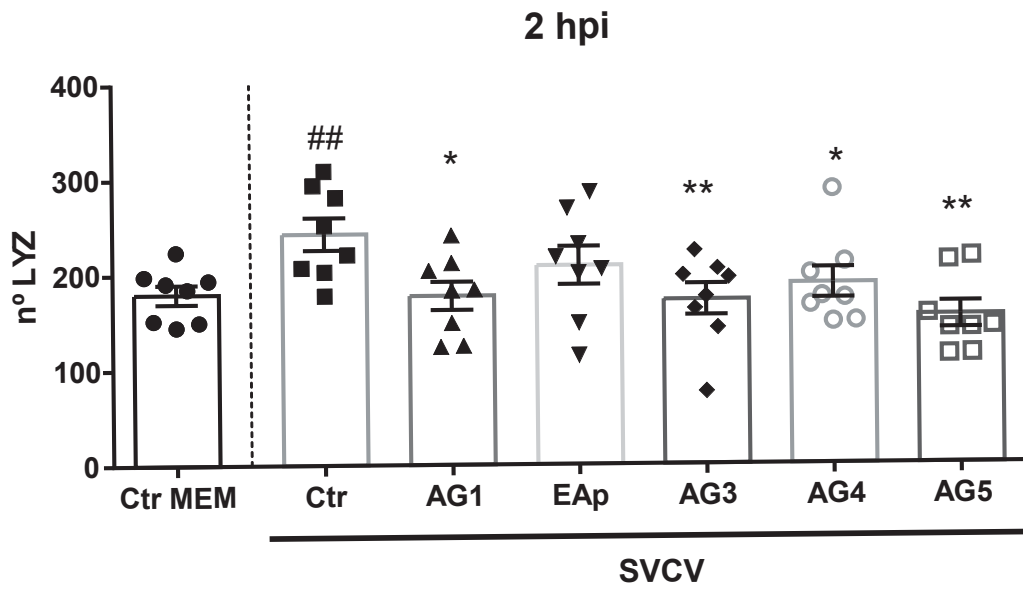


Fig. 1

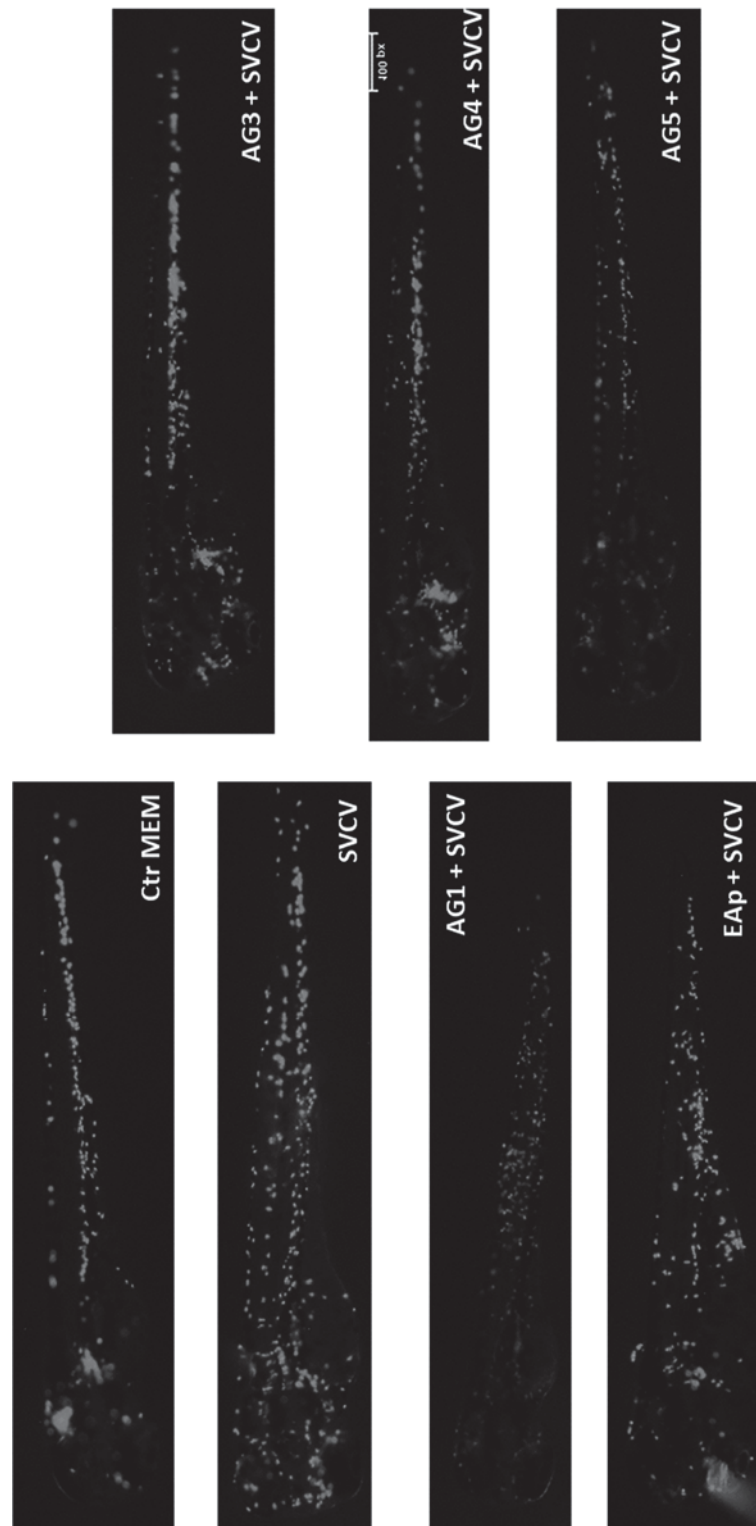


Fig. 2

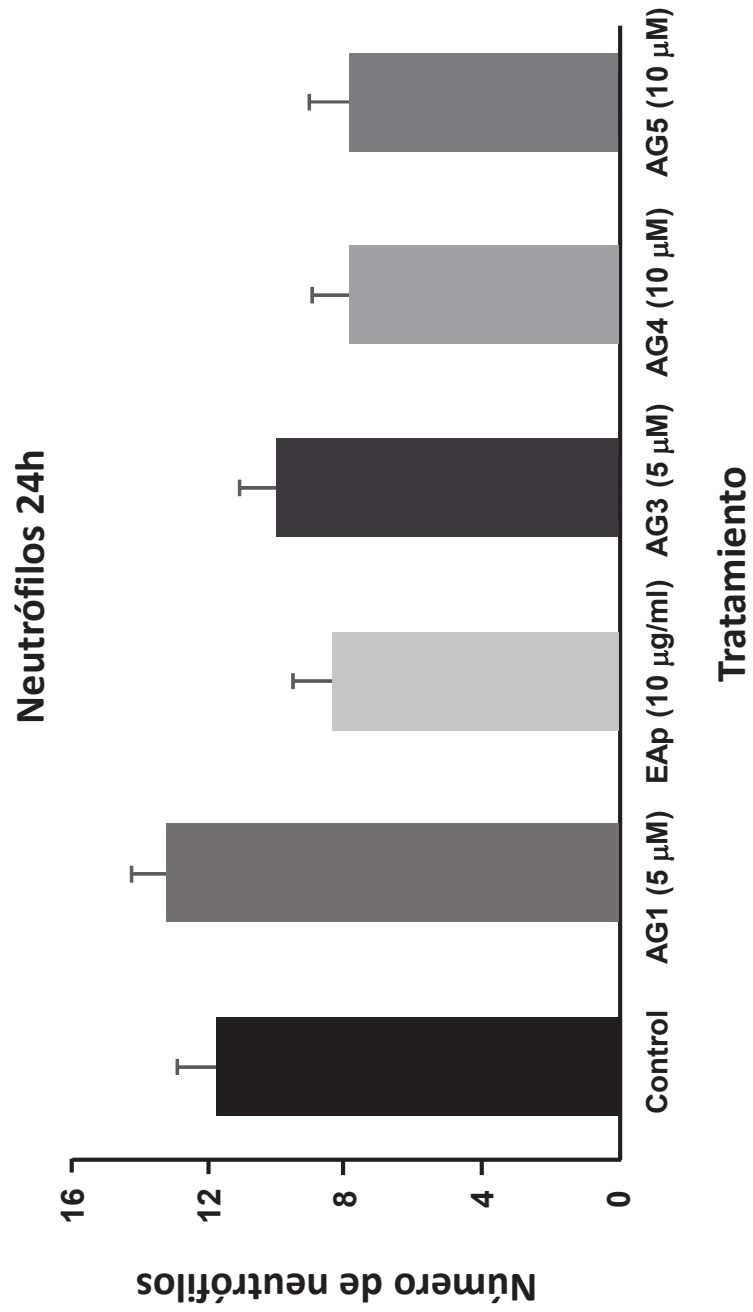


Fig. 3

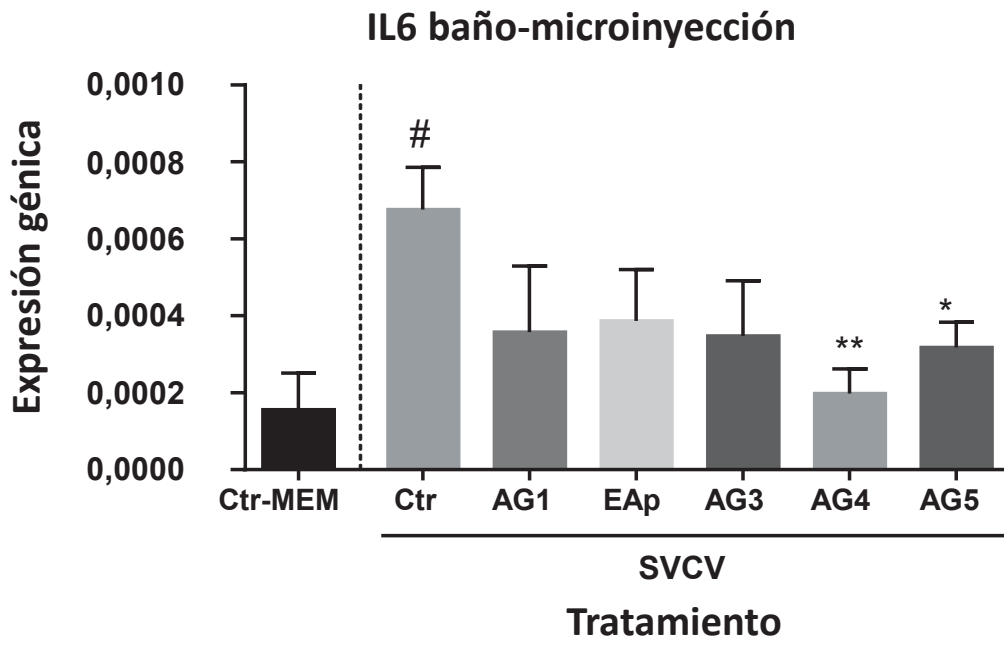


Fig. 4