



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 015**

51 Int. Cl.:  
**C07K 5/02** (2006.01)  
**A61K 38/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04805051 .2**  
96 Fecha de presentación : **29.12.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1701973**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2006**

54 Título: **Derivados de glutatión y sus usos para el tratamiento de enfermedades virales.**

30 Prioridad: **30.12.2003 IT T003A1048**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.02.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.02.2011**

73 Titular/es: **FIRST - Societa' a Responsabilita'  
Limitata con socio unico  
Viale William Shakespeare 47  
Roma, IT**

72 Inventor/es: **Magnani, Mauro;  
Brandi, Giorgio;  
Millo, Enrico;  
Palamara, Anna Teresa;  
Benatti, Umberto;  
Garaci, Enrico y  
Rossi, Luigia**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

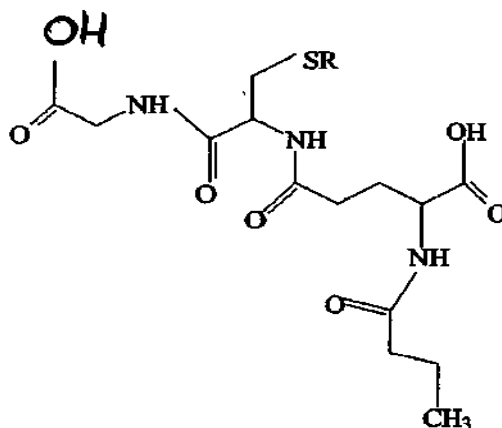
ES 2 352 015 T3

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).

## DESCRIPCION

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a derivados de glutatión de fórmula I:



15 y a su uso en forma de fármacos antivirales, en particular para el tratamiento de paramixovirus, ortomixovirus, herpesvirus y VIH.

El glutatión (también conocido con la abreviatura GSH) es un tripéptido ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) que contiene cisteína que se encuentra en las células eucarióticas en concentraciones milimolares y tiene numerosas funciones en la fisiología celular: protege las células contra el estrés oxidativo, manteniendo el estado redox intracelular en condiciones reductoras, mediante intraconversión metabólica, en su forma oxidada de disulfuro.

TÉCNICA ANTERIOR

Se sabe y se ha comunicado en numerosos artículos que durante las infecciones virales se produce una reducción progresiva de GSH con la consiguiente alteración del equilibrio redox intracelular.

Desafortunadamente, el GSH se oxida rápidamente en vivo, en particular en presencia de infecciones virales, situación en la que se desequilibra el estado redox de las células. El GSH oxidado se reduce, a su vez, mediante la glutatión reductasa celular o se elimina de las células por medio de un mecanismo dependiente del ATP. La reducción del glutatión mediante enzimas celulares depende de la disponibilidad de equivalentes reductores en la célula (NADH, NADPH), que ya están agotados en caso de infección patógena.

Datos recientes informan, por ejemplo, de que durante infecciones *in vitro* con el virus Sendai parainfluenza 1 (SV), el virus herpes simplex-1 (HSV-1) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tiene lugar una disminución progresiva de los niveles de GSH. Muchos estudios en vivo informan también de la existencia de un desequilibrio del estado redox en las células y fluidos corporales de

pacientes afectados por VIH y hepatitis C. Además, durante infecciones virales experimentales con el virus de la gripe, se ha descrito una disminución de las defensas antioxidantes y un aumento simultáneo de productos de oxidación lipídica en los pulmones e hígados de animales sacrificados el séptimo día después de la infección.

5 Muchos datos sugieren que un desequilibrio del estado redox celular es un suceso clave en el ciclo replicativo de virus, ya que provoca tanto un aumento de la replicación como la activación de factores de transcripción nuclear.

También se sabe que la administración de glutatión reducido a células infectadas evita el aumento de GSH intracelular e inhibe la replicación viral en infecciones con SV, HSV-1 y VIH, tal como se  
10 informa, por ejemplo, en el artículo de Palamara, A. T., Perno, C. F., Ciriolo, M. R., Dini, L., Balestra, E., D'Agostini, C. y col. (1995) "Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication" en la publicación Antiviral Research 27, 237-253, y en el artículo de Garaci, E., Palamara, A. T., Di Francesco, P., Favalli, C., Ciriolo, M. R. y Rotilio, G. (1992),  
15 "Glutathione inhibits replication and expression of viral proteins in cultured cells infected with Sendai virus" en la publicación Biochemical and biophysical research communications 188, 1090-1096.

En modelos experimentales, la actividad antiviral del GSH parece estar correlacionada con una inhibición de las fases postranscripcionales de la replicación viral, evitando, probablemente, el plegamiento correcto y la maduración de proteínas específicas. La eficacia de sustancias antioxidantes en infecciones virales se ha demostrado en estudios en vivo, en particular en el artículo  
20 de Palamara, A. T., Garaci, E., Rotilio, G., Ciriolo, M. R., Casabianca, A., Fraternali, A. y col. (1996c) "Inhibition of murine AIDS by reduced glutathione" en AIDS research and human retroviruses 12, 1373-1381.

La administración de dosis elevadas de GSH reduce la infección viral e inhibe la progresión de la enfermedad, incluso, por ejemplo, en un modelo murino de SIDA.

25 Sin embargo, un problema que surge con el uso y la administración de GSH y que es el problema del que se ocupa la presente invención, es el hecho de que, aunque la actividad antiviral de las sustancias antioxidantes se ha demostrado claramente, se ha comprobado también que el GSH no se transporta como tal en la mayor parte de las células o tejidos.

#### DIVULHACIÓN DE LA INVENCION

30 Sería deseable, por este motivo, obtener moléculas que mantengan las características ventajosas del GSH permitiendo, simultáneamente, solucionar el problema del transporte y que, por lo tanto, faciliten el cruce de la membrana celular de muchos tipos de células.

Según la presente invención, este problema se resuelve por medio de derivados de glutatión de fórmula I.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Ahora se describirá la invención, también con referencia a las figuras acompañantes, en las que:

La Figura 1 muestra la fórmula estructural de un derivado de glutatión según la presente invención, es decir, de n-glutanoil- $\gamma$ -glutamilcisteinglicina (también conocido por la abreviatura GSH-C4), junto con su análisis de espectrometría de masas tras purificación por HPLC. El análisis, realizado en modo de ion negativo, destaca la presencia de un único pico de masas a 376,7, correspondiente a la molécula monocargada de interés ([M-H]).

La figura 2 muestra el efecto del GSH-C4 sobre la replicación del virus Sendai.

La figura 3 muestra los efectos del GSH-C4 sobre la replicación del HSV-1.

Según la presente invención, con los derivados de glutatión (GSH) de fórmula I puede obtenerse una actividad antiviral potente *in vitro*, tanto contra virus ARN (parainfluenza-1, Sendai) como contra virus ADN (herpes simplex, HSV-1), atravesando la membrana celular tanto de células MDCK y células Vera, y sin causar efectos tóxicos sobre células no infectadas. El GSH puede considerarse un agente antimicrobiano que ejerce su actividad por medio de mecanismos diferentes dependiendo del sistema huésped-patógeno en cuestión y de la concentración usada.

Los derivados de la presente invención se obtienen mediante condensación de un ácido carboxílico del grupo  $\mu$ -NH<sub>2</sub> del ácido glutámico.

Los compuestos se sintetizan en el laboratorio usando procedimientos convencionales de síntesis de péptidos en fase sólida.

Se ha encontrado que el butanoil-glutatión según la invención, que a continuación, por conveniencia, se indica también con la abreviatura GSH-C4, actúa con un mecanismo diferente al mostrado para el glutatión (GSH). De hecho, además de inhibir significativamente la replicación de HSV-1, es capaz de evitar los efectos citopáticos inducidos por el virus en células Vero e inhibir, también, la replicación del virus parainfluenza Sendai en células MDCK, probablemente interfiriendo con factores celulares esenciales durante la infección viral.

Una de las ventajas de la invención consiste en el hecho de que el GSH-C4 o un derivado del mismo de fórmula I puede usarse preferentemente en forma de fármaco hidrosoluble, pero también en forma de crema o loción para el tratamiento de patologías por herpes simplex 1 y 2 mediante administración tópica.

El butanoil glutatión de fórmula I puede considerarse un agente antimicrobiano de interés contra varios agentes patógenos, ya que, según una característica de la invención, reduce tanto la infectividad viral en la primera fase de la enfermedad como la producción viral en una fase más avanzada, una característica ventajosa que puede, actualmente, considerarse única.

#### MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

La invención se describirá ahora con referencia a ejemplos específicos de realizaciones y de ensayos de los derivados según la invención, sin pretender limitar la invención a dichos ejemplos.

## Ejemplo 1

Síntesis de derivados de glutatión (GSH-C2, GSH-C4, GSH-C6, GSH-C8, GSH-C12)

Los compuestos se sintetizaron en el laboratorio usando procedimientos convencionales de síntesis peptídica en fase sólida, en particular usando la técnica Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo), modificada  
5 adecuadamente. Se encontró, entonces, que el butanoil glutatión GSH-C4 solo era capaz de resolver los problemas técnicos de los que se encarga la presente invención y, por lo tanto, los experimentos subsiguientes se realizaron únicamente con este derivado.

Todas las síntesis en laboratorio se realizaron mediante técnica manual usando un recipiente de reacción adecuado que contenía resina de poliestireno (resina Wang-Gly-Fmoc producida por  
10 Novabiochem AG, Laufelfingen, Suiza) funcionalizada con una glicina que tiene el grupo N-terminal protegido por un grupo Fmoc.

El ciclo de síntesis estándar comprendió la fase de pretratamiento de la resina por suspensión en diclorometano (Biosolve LTD, Países Bajos) durante una noche, después de la cual se eliminó el grupo de protección con piperidina (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza) en N,N-dimetilformamida (DMF)  
15 (Biosolve LTD, Países Bajos) durante 20 minutos. Simultáneamente, se preactivaron 5 equivalentes (eq.) del aminoácido Fmoc apropiado (Advanced Biotech Italia, Italia) con hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) (Advanced Biotech, Italia), 5 eq. de N,N-diisopropiletilamina, a una concentración final 0,2 M en N-metilpirrolidona anhidra (Biosolve LTD, Países Bajos). Esta solución se elaboró para hacerla reaccionar con la resina neutralizada *in situ*  
20 durante aproximadamente 1 hora a 40 °C.

Subsiguientemente, se lleva a cabo una reacción, prudentemente, con una solución de anhídrido acético al 5 % (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza) en DMF para evitar reacciones no deseadas de cualesquiera grupos amina que permanecen libres.

## Ejemplo 2

Se preparó el derivado de butanoil glutatión (GSH-C4) para el tratamiento de la resina que contenía la porción peptídica con ácido n-butanoico (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza) activada previamente tal como ya se ha descrito por medio de aminoácidos. Los derivados de etanoil, hexanoil, octanoil y dodecanoil (GSH-C2, GSH-C6, GSH-C8 y GSH-C12) se prepararon mediante procedimientos similares, usando respectivamente anhídrido acético y ácidos hexanoico, octanoico y dodecanoico  
30 (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza) en lugar del ácido butanoico.

El desprendimiento del compuesto sintetizado de la resina y la eliminación simultánea de los grupos protectores de cadena lateral se realizó usando una solución compuesta por ácido trifluoroacético (TFA) (Biosolve LTD, Países Bajos), etanoditiol (FlukaChemieAG, Buchs, Suiza), agua y triisopropilsilano (FlukaChemie AG, Buchs, Suiza) en proporción 92,5:2,5:2,5:1 V/V durante un periodo  
35 de 2 horas a temperatura ambiente. La solución ácida se concentró a vacío hasta un volumen final de

aproximadamente 1 ml y el producto final precipitado con dietil éter frío y subsiguientemente se lavó con el mismo disolvente.

Todas las moléculas se purificaron por cromatografía líquida en fase inversa (HPLC-FI) usando una columna Waters C18  $\mu$ Bondapack, en la que el disolvente A estaba compuesto por TFA al 0,1 % en agua y el disolvente B por el mismo porcentaje de ácido en acetonitrilo. La elución de los compuestos tuvo lugar con un gradiente que comenzó con el 100 % de disolvente A durante 5 minutos, se incrementó linealmente hasta el 60 % de disolvente B en 30 minutos y terminó finalmente con el 100 % de B en 5 minutos.

Las fracciones que contenían las moléculas de interés se recogieron, se concentraron al vacío y después se liofilizaron. Los pesos moleculares de los derivados de glutatión se confirmaron por análisis de espectrometría de masas. Los espectros de masas de cada compuesto se obtuvieron usando un espectrómetro HP Engine 5989-A con cuádruplo sencillo equipado con una fuente de electropulverización en modo de ion negativo. Todos los productos se obtuvieron con un rendimiento final que variaba del 75 al 78 % y una pureza del 95 % después del análisis por HPLC. Un ejemplo de los espectros de masas obtenidos se muestra en la Figura 1.

#### Ejemplo 3

Para realizar el estudio de toxicidad sobre las células se analizaron todos los compuestos obtenidos (GSH-C2, GSH-C4, GSH-C6, GSH-C8, GSH-C12) sobre monocapas confluentes de células renales caninas Madin Darby (MDKC) no infectadas. La toxicidad se midió sobre la base de exámenes microscópicos de morfología celular, de medición de la vitalidad celular después de tinción con azul tripán y del recuento de células. Todos los compuestos se diluyeron en medio RPMI, siendo el pH final de la solución de aproximadamente 7-7,3.

#### Ejemplo 4

Las determinaciones enzimáticas de la actividad de glutatión peroxidasa (E.C.1.11.1.9.) y glutatión S-transferasa (E.C.2.5.1.18.) en sangre humana hemolizada en presencia de GSH y de su derivado GSH-C4 se realizaron según los procedimientos de Beutler (Beutler, E., 1984, Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods, 3ª edición, Grune & Stratton, Nueva York). El GSH y el GSH-C4 se oxidaron después mediante incubación a temperatura ambiente en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para obtener respectivamente GSSG y C4-GSSG-C4.

#### Ejemplo 5

Se midió la entrada de GSH y GSH-C4 en eritrocitos (RBC) a 37 °C en tubos de ensayo de microcentrífuga usando el procedimiento de detención por medio de aceite. Se incubaron suspensiones de eritrocitos con un 10 % de hematocrito que contenían 5 mM de GSH o GSH-C4 y una concentración 10 mM de GSH durante 2 h a 37 °C. En diferentes tiempos (0, 5, 15, 30, 60 y 120 min), se estratificaron tasas de 600  $\mu$ l sobre 600  $\mu$ l de bromododecano, se centrifugaron durante 5 min a 10.000

rpm y se midió el contenido en GSH y GSH-C4 en glóbulos rojos (Beutler, E., 1984, Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods, 3ª edición. Grune & Stratton, Nueva York).

#### Ejemplo 6

5 La estabilidad de GSH-C4 en plasma se midió usando el procedimiento siguiente: Se incubó GSH-C4 (1 mM) en plasma humano a 37 °C y durante diferentes tiempos de incubación (0, 15, 30, 60 y 120 min), se ultrafiltraron porciones de 200 µl usando microconcentradores Amicon Centricon mediante centrifugación a 2.000 rpm durante 30 min. La solución filtrada se analizó después mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) para medir el contenido de GSH-C4 y C4-GSSG-C4.

#### Ejemplo 7

10 Para medir el comportamiento de los derivados de GSH-C4 en células infectadas, se cultivaron células renales caninas Madin Darby (MDCK) en RPM11640 a las que se añadió un 5 % de suero fetal bovino descomplementado por calor (Flow Laboratories, Italia).

El virus Senday (SV), perteneciente a la familia de los paramixovirus, es un virus con ARN monocatenario no segmentado de polaridad negativa. Este virus se reprodujo mediante inoculación  
15 en el líquido alantoico de huevos de gallina embrionados. Se infectaron las monocapas de células MDCK con SV [3 unidades hemaglutinantes (HAU) x 10<sup>5</sup> células]. Después de incubar durante 1 hora a 37 °C (periodo de adsorción), se retiraron los virus no adsorbidos, se lavaron las monocapas y después se incubaron en un medio completo que contenía un 2 % de suero fetal bovino. Se determinó la producción de virus por células infectadas en los sobrenadantes celulares a intervalos de  
20 tiempo diferentes a partir de la infección (p.i.), midiendo la actividad hemaglutinante hacia eritrocitos humanos de tipo 0 Rh+ (HAU), de acuerdo con procedimientos estándar. Para medir la actividad antiviral se diluyeron los compuestos GSH-C2, GSH-C4, GSH-C6 en medio RPMI a pH 7,3, añadiéndose a la concentración deseada, inmediatamente después del periodo de adsorción del virus. Se cultivaron células renales de mono (VERO) en medio RPMI, al que se añadió un 5 % de suero. El virus  
25 herpes simplex humano de tipo 1 (HSV-1), aislado clínicamente (TV1), se cultivo y se valoró en las células Vera tal como se describe en Palamara, A. T., Perno, C. F., Ciriolo, M. R., Dini, L, Balestra, E., D'Agostini, C. y col. (1995). Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. Antiviral Research 27, 237-253.

Para obtener la infección viral, se infectaron monocapas de células Vera con HSV-1 en una MDI  
30 (multiplicidad de infección) de 0,03 UFP/célula. Después de incubar durante 1 hora a 37 °C (periodo de adsorción), se retiraron los virus no adsorbidos, se lavaron las monocapas y después se incubaron usando un medio de cultivo que contenía un 2 % de suero fetal bovino. Se añadió GSH-C4 en dosis idénticas a las indicadas anteriormente inmediatamente después del periodo de adsorción y se mantuvieron en el medio de cultivo hasta completar los experimentos. Los  
35 sobrenadantes de células infectadas se recogieron en tiempos diferentes después de la puesta en

contacto con los virus y se analizó la capacidad de formar placas en células Vera usando un procedimiento de valoración estándar. Se realizaron también experimentos similares sobre HSV-1 TK-D305. Los resultados obtenidos sobre la base de los ejemplos descritos se resumen a continuación.

#### 5 Toxicidad de derivados GSH

Se encontró que los derivados de GSH-C4 y GSH-C2 no provocan ningún efecto tóxico o cambio en morfología celular en las concentraciones usadas en los experimentos realizados. Por contra, la adición de los derivados C8 (n-octanoil) y C12 (n-dodecanoil) provocó efectos tóxicos marcados y dañó las células de las monocapas de células MDCK no infectadas. El aumento de estos efectos depende de la dosis administrada y se observó que comenzaban a partir de concentraciones 0,1 mM. Por esta razón, no se tomo en cuenta su actividad sobre la replicación viral. El tratamiento de células MDCK con glutatión-C6 provocó daños sobre las capas monocelulares no infectadas exclusivamente a la concentración 10 mM. Se encontraron algunas modificaciones en la morfología celular 24 horas después de la adición en concentraciones 2,5 y 5 mM. Estas sustancias provocan una inhibición de la replicación viral de desde el 50 % (2,5 mM) al 100 % (10 mM). Debido a la limitada diferencia entre la dosis citotóxica y la dosis antiviral, el derivado GSH-C6 se descartó ya que no era óptimo.

Se realizó después una selección inventiva entre los distintos derivados posibles de glutatión con el fin de encontrar los que podían obtener los mejores efectos como agentes antivirales y se encontró, sorprendentemente, que solo con derivados de GSH-C4 según la fórmula I es posible obtener una eficacia antiviral adecuada y simultáneamente solucionar los problemas relacionados con el uso de GSH mencionados anteriormente.

#### Metabolismo del derivado GSH-C4

Las actividades enzimáticas de glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa se midieron en sangre humana hemolizada en presencia de GSH-C4 o GSH 2 mM como sustratos. Las actividades de glutatión peroxidasa y de glutatión S-transferasa en presencia de GSH-C4 fueron del 1,8 % y del 3,5 % respectivamente, en comparación con las obtenidas en presencia de GSH. Además, el GSH y el GSH-C4 se oxidaron químicamente en las formas disulfuro correspondientes (GSSG y C4-GSSG-C4). La actividad de glutatión reductasa se midió sobre ambos sustratos y los resultados obtenidos mostraron que la forma oxidada de C4-GSSG-C4 se reduce gradualmente con una actividad enzimática de 0,63 UI/g de hemoglobina (Hb), una Km 50 mM y una Vmax igual a 12,6 (xmol/min/mg Hb), mientras que la forma oxidada de GSH se reduce por medio de la glutatión reductasa con una actividad de 3,0 UI/g de Hb, una Km 1,3 mM y una Vmax de 6,3  $\mu$ mol/min/mg Hb. Estos resultados muestran que una vez se ha formado el dímero oxidado GSH-C4, la glutatión reductasa celular es incapaz de reducir eficazmente el compuesto.

#### 35 Entrada de GSH-C4 en los eritrocitos

La entrada de GSH-C4 en los eritrocitos se midió y se comparó con la entrada de GSH. Los resultados obtenidos muestran que el GSH-C4 atraviesa la membrana de los eritrocitos más rápidamente que el GSH, resolviendo de este modo el problema técnico del que se encarga la presente invención; de hecho, la velocidad de entrada (calculada en los primeros 30 minutos) fue de 4,33 nmol/min/ml de glóbulos rojos para el GSH-C4 y de 2,33 nmol/min/ml de glóbulos rojos para el GSH.

Efectos del GSH-C4 sobre la replicación del virus Sendai.

Se observó que la adición de GSH-C2 a células MDCK infectadas con el virus Sendai provocó una ligera reducción en la replicación viral medida como actividad hemaglutinante en el sobrenadante.

En particular, la adición del derivado de glutatión a concentraciones 5,0 y 7,5 mM provocó una inhibición de la valoración viral del 30 % y del 40 % respectivamente.

Recíprocamente, la adición de GSH-C4 mostró un efecto muy superior. El efecto de GSH-C4 sobre la reproducción del virus Sendai en células MDCK se muestra también en la Figura 2.

Las células MDCK se infectaron durante 1 hora con 3 unidades hemaglutinantes (HAU) x 10<sup>5</sup> células.

Las células se lavaron y después se cultivaron en presencia de concentraciones diferentes de GSH-

C4 (intervalo 0-7,5 mM) durante 2 días. La producción del virus se analizó a 24 horas (panel A) y a 48

horas (panel B) midiendo la actividad hemaglutinante sobre eritrocitos humanos de tipo 0 Rh+.

La inhibición de la replicación del virus Sendai depende de la dosis de GSH-C4 administrada. Se obtuvo

un grado de inhibición que variaba del 88 % (24 h de p.i.) al 93 % (48 h de p.i.) en presencia de GSH-

C4 5 mM. En el sobrenadante de células tratadas con la composición que contenía GSH-C4 7,5 mM

no se encontraron virus. La dosis 7,5 mM de GSH-C4 demostró, por lo tanto, ser óptima ya que es

suficiente para producir un efecto antiviral excelente sin ser tóxica para las células, como se confirmó

también mediante el examen microscópico de las monocapas. A 48 h se obtiene el 50 % de inhibición

de la reproducción viral (CE50) con GSH-C4 a una dosis sólo 3,6 mM, mientras que se requiere una

concentración total 7,6 mM de GSH para obtener el mismo resultado.

Efecto de GSH-C4 sobre la replicación de HSV-1

El efecto de diferentes dosis de GSH-C4 sobre la replicación de HSV-1 en células VERO se muestra en la Figura 3, que indica el porcentaje de inhibición de replicación del virus 48 h después de la infección.

Se infectaron células VerO durante 1 hora con HSV-1 a una MDI de 0,03 UFP/célula. Después de

repetir los lavados, se añadió GSH-C4 a diferentes concentraciones (intervalo 0-10 mM) a los cultivos

celulares. La replicación de los virus se analizó en las células Vera 48 horas después de la infección

usando la técnica de placas. La Figura 3 muestra los resultados de cuatro experimentos diferentes que

concuerdan dentro del 10 % de los valores indicados.

Los resultados obtenidos muestran que la inhibición de la replicación de los virus depende de la dosis

de GSH-C4 administrada. Se obtuvo una disminución marcada (60 % de inhibición en comparación

con el control) en la replicación viral añadiendo una concentración 7,5 mM de GSH-C4. A una dosis

10 mM no se detectó en el sobrenadante celular ninguna partícula de virus. Se encontró la misma inhibición 72 h después de la infección.

La adición de GSH a una concentración 10 mM no induce la inhibición completa del virus y sólo produce una reducción en la replicación del virus de aproximadamente 2,5 log. Además, el GSH-C4  
5 protege las células Vera de los efectos citopáticos inducidos por los virus y no induce ningún efecto tóxico en células Vero no infectadas. El efecto del GSH-C4 se analizó también sobre una cepa de virus defectuosos por timidina quinasa ( $\Delta$ 305).

Se infectaron células Vero durante 1 h a 37 °C con la cepa  $\Delta$ 305 y después se mantuvieron en cultivo en presencia de diferentes concentraciones de GSH-C4. La producción de virus se midió 24, 48 y 72 h  
10 después de la infección mediante ensayo de unidades formadoras de placas.

La tabla muestra los resultados de un experimento representativo de tres. La variabilidad entre resultados obtenidos en los diversos experimentos no excedió el 10 %.

Tab. 1 Efectos de GSH-C4 sobre HSV-1 TK-

	HSV-1 TK-(ufp/ml)		
	24 h	48 h	72 h
Ctr.	1,38 x 10 <sup>5</sup>	1,96 x10 <sup>5</sup>	2,56 x10 <sup>5</sup>
5 mM	2,59x10 <sup>5</sup>	2,42 x10 <sup>6</sup>	2,13X10 <sup>6</sup>
7,5 mM	1,59 x 10 <sup>5</sup>	2,56 x10 <sup>5</sup>	4,33 x10 <sup>5</sup>
10 mM	1,53 X 10 <sup>5</sup>	2,6 X 10 <sup>5</sup>	3,44X10 <sup>5</sup>

15 Los resultados obtenidos muestran que el GSH-C4 es menos activo contra la cepa TK- en comparación con cuando se usa sobre la cepa de tipo silvestre. De hecho, se observa una inhibición significativa de la valoración del virus (aproximadamente 1 log) sólo a una concentración 7,5 mM 72 h después de la infección.

Finalmente, es aparente que como se ha demostrado experimentalmente que los derivados según la presente invención son eficaces en el tratamiento de enfermedades derivadas del  
20 virus Sendai y, por lo tanto, de paramixovirus, son también eficaces contra ortomixovirus. Además, como todos los análisis realizados concuerdan en confirmar la eficacia contra varios virus, es obvio inferir que los derivados de GSH-C4 de fórmula I son agentes antivirales.

Finalmente, aunque los ejemplos son relativos a los derivados de GSH-C4 en los que sólo el grupo SH no está sustituido, es legítimo asumir que todos los derivados en los que el grupo SH del GSH-C4 según la presente invención está sustituido con grupos protectores son igualmente eficaces en tratamientos antivirales.

5

10

15

20

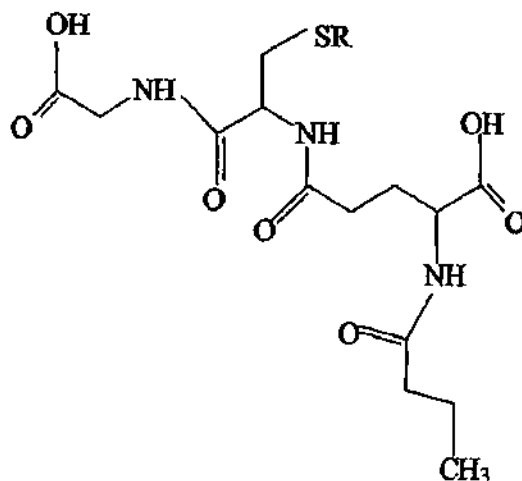
25

30

35

## REIVINDICACIONES

1. Derivados de glutatión de fórmula I:



en la que R es un grupo protector tiol.

2. Derivados de glutatión de fórmula I, en la que R es H o acetilo.
3. Derivados tal como se reivindican en la reivindicación 1 ó 2 para su uso como medicamento.
4. Derivados tal como se reivindican en la reivindicación 1 ó 2 para su uso como medicamento antivirales.
5. Derivados tal como se reivindican en la reivindicación 1 ó 2 para el tratamiento de enfermedades provocadas por paramixovirus.
6. Derivados tal como se reivindican en las reivindicaciones 1 ó 2 para el tratamiento de enfermedades provocadas por ortomixovirus.
7. Derivados tal como se reivindican en la reivindicación 1 para su uso como medicamentos para el tratamiento de enfermedades provocadas por herpes simplex-1.
8. Derivados tal como se reivindican en la reivindicación 1 para su uso como medicamentos para el tratamiento de enfermedades provocadas por VIH.
9. Preparación farmacéutica **caracterizada porque** comprende un derivado de glutatión que tiene la fórmula general (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un excipiente y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.
10. Uso de un derivado de glutatión de fórmula (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2 para la producción de una preparación farmacéutica antiviral.
11. Uso de un derivado de glutatión de fórmula (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2 para la producción de una preparación farmacéutica para el tratamiento de enfermedades provocadas por

paramixovirus.

12. Uso de un derivado de glutatión de fórmula (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2 para la producción de una preparación farmacéutica para el tratamiento de enfermedades provocadas por ortomixovirus.

5 13. Uso de un derivado de glutatión de fórmula (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2 para la producción de una preparación farmacéutica para el tratamiento de enfermedades provocadas por herpes simplex-1.

14. Uso de un derivado de glutatión de fórmula (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2 para la producción de una preparación farmacéutica para el tratamiento de enfermedades provocadas por VIH.



Fig. 2A

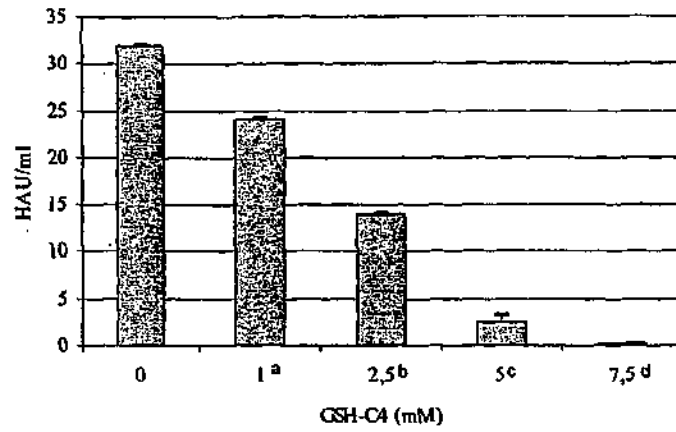


Fig. 2B

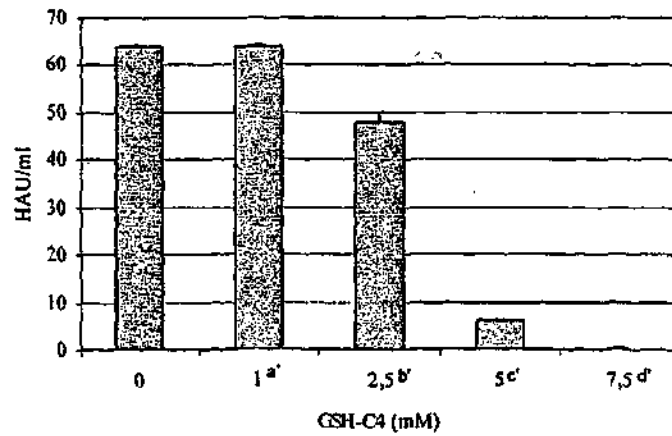


Fig. 3

