

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 817**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2007 E 07766205 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2043661**

54 Título: **Uso de tilvalosina como agente antiviral**

30 Prioridad:

13.07.2006 GB 0613952

01.11.2006 GB 0621782

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

15.01.2015

73 Titular/es:

ECO ANIMAL HEALTH LTD (50.0%)

78 Coombe Road

New Malden Surrey KT3 4QS, GB y

CAMBRIDGE UNIVERSITY TECHNICAL

SERVICES LIMITED (50.0%)

72 Inventor/es:

MOCKETT, ALBERT PHILIP ADRIAN;

BROWN, THOMAS DAVID KAY y

STUART, AMANDA DENISE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 526 817 T3

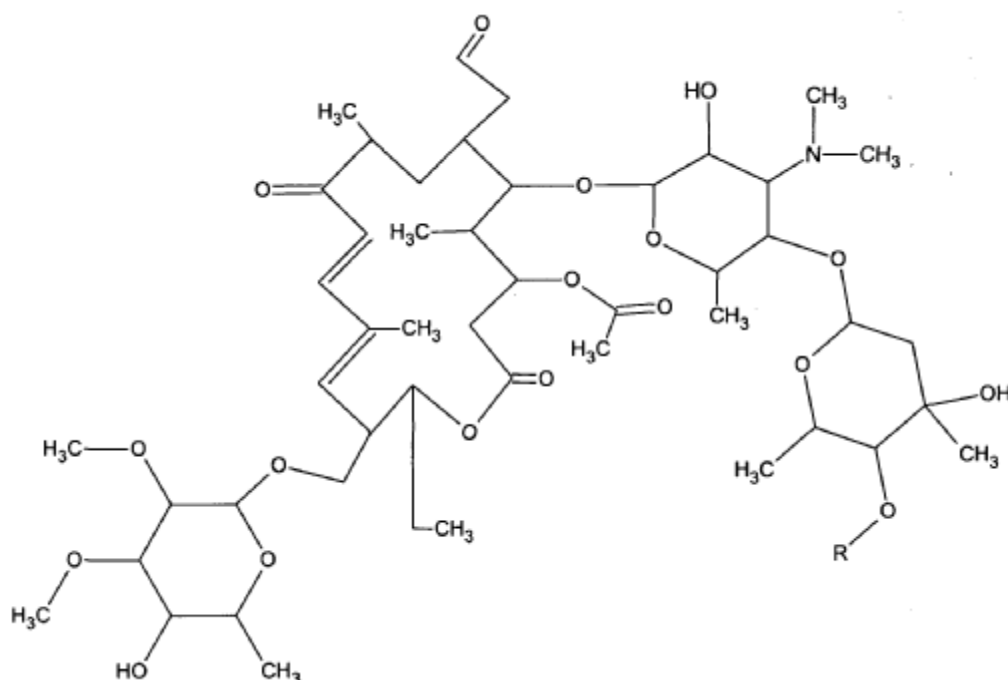
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Uso de tilvalosina como agente antiviral

- 5 La invención se relaciona con el uso de un antibiótico en la preparación de un medicamento antiviral. La invención también se relaciona con tilvalosina para uso en un método de tratamiento para una infección viral que comprende la administración de un antibiótico a un sujeto que sufre de una infección viral.

10 Tilvalosina es el nombre INN provisional de la acetilisovaleriltilosina y es un antibiótico macrólido. El producto que contiene tilvalosina se conoce como Aivlosin®. Se lo utiliza para una diversidad de tratamientos, en especial para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas en los animales de granja. La tilvalosina es un derivado de la tilosina, y tiene la siguiente fórmula:



15 En la que R es isovaleril.

20 Cuando el ganado se cría en operaciones a gran escala, en especial con cría intensiva, los animales tienen tendencia a sufrir de ciertas enfermedades. Estas enfermedades también tienden a propagarse con rapidez en el ganado. Una de estas enfermedades es el síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS, por sus siglas en inglés). PRRS está causado por un virus, PRRSV, y afecta a los cerdos de todas las edades. Cuenta con signos tanto respiratorios como reproductivos, y se considera que cuesta a la industria porcina mundial cientos de millones de libras esterlinas al año.

25 PRRS a menudo se complica con una infección bacteriana, en especial una infección de *Mycoplasma hyoneumoniae* (M-hyo). Esta infección es generalizada en las poblaciones porcinas, y causa neumonía. Cuando un cerdo está infectado de M-hyo y de PRRSV, la neumonía puede ser muy grave. En la actualidad, Aivlosin® (tilvalosina) se usa para tratar M-hyo, en cerdos con y sin PRRS.

30 Los inventores sorprendentemente hallaron que Aivlosin® (tilvalosina) puede usarse para tratar PRRSV solo. Los inventores han hallado que Aivlosin® (tilvalosina) tiene efecto directo sobre el virus.

35 La actividad antibacteriana de tilvalosina se describe en US 4,092,473, mientras que el uso de tilvalosina para tratar enteritis necrótica en aves e infecciones de *Lawsonia* se describe en WO 02/32233. El uso de tilvalosina para tratar enfermedades causadas por *Brachyspira pilosicoli* en cerdos y *Ornithobacterium rhinotracheale* en aves se describe en WO 2005/002593. Las actividades antibacterianas y antimicoplasmáticas de la tilvalosina para tratar infecciones de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* se describen en Okamoto et al (1980) Journal of Antibiotics Vol 33 Issue 11 1309-1315.

40 Hasta ahora, Aivlosin® sólo se ha empleado para tratar infecciones bacterianas tales como M-hyo. Aivlosin® (tilvalosina) no ha sido usado para tratar infecciones virales. Si bien Aivlosin® (tilvalosina) se ha usado para tratar M-hyo en cerdos con PRRS, no se sabía que podía tener efecto sobre la infección viral al igual que sobre la infección bacteriana.

No es usual que un antibiótico tenga efecto sobre una infección viral. La tilvalosina es un antibiótico macrólido. Otros macrólidos tienen efecto muy variado sobre los virus. Se ha demostrado que la tilmicosina tiene eficacia contra algunos virus, incluyendo PRRSV. Sin embargo, la tilmicosina es mucho más tóxica que la tilvalosina en los ensayos de potencia antiviral con cultivo de células. Además, la tilosina, el antibiótico con el cual la tilvalosina está más estrechamente relacionada, no tiene efecto contra PRRSV, y no se conoce que tenga efecto sobre ningún otro virus.

Conforme a la invención, se provee el uso de tilvalosina, o de un derivado funcional, metabolito, éster o sal de la misma, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección de un virus, donde el derivado funcional o metabolito de la tilvalosina se selecciona a partir de 3-O-Acetildesmicosina, 3-O-Acetiltilosina, 3,4"-di-O-Acetiltilosina, a-O-Acetil-4"-O-propioniltilosina, 3-O-Acetil-, 4"-O-Isovalerilmacrocin, 3-O-Acetil-4"-O-butiltilosina, 3-O-Acetil-4"-O-isovalerilrelomicina, 4"-O-Isovaleriltilosina, 3,20-di-O-Acetil-4"-isovalerilrelomicina, y 3,4""-di-O-Acetil-4"-O-isovaleriltilosina

Como ya se indicó, la tilvalosina es un antibiótico macrólido llamado 3-O acetil-4"-O-isovaleriltilosina. La tilvalosina es bien conocida en el arte. Los derivados y metabolitos de la tilvalosina incluyen cualquier compuesto estrechamente relacionado con la tilvalosina o en el que la tilvalosina se convierte en una solución o cuando se lo administra a un sujeto. Los derivados y metabolitos de la tilvalosina incluyen una serie de compuestos hallados como sustancias relacionadas, en especial en solución, tales como 3-O-Acetildesmicosina, 3-O-Acetiltilosina, 3,4"-di-O-Acetiltilosina, 3-O-Acetil-4"-O-propioniltilosina, 3-O-Acetil-4"-O-Isovalerilmacrocin, 3-O-Acetil-4"-O-butiltilosina, 3-O-Acetil-4"-O-isovalerilrelomicina, 4"-O-Isovaleriltilosina, 3,20-di-O-Acetil-4"-isovalerilrelomicina, and 3,4""-di-O-Acetil-4"-O-isovaleriltilosina. La tilvalosina puede estar en la forma de Aivlosin ®.

Cuando la tilvalosina está presente en la forma de un éster farmacéuticamente aceptable, se prefiere un alquiléster del mismo. Cuando la tilvalosina está presente en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, puede usarse cualquier sal adecuada. Se prefieren las sales formadas con ácidos orgánicos, en especial las sales formadas con ácidos tales como el ácido ascórbico, glicólico, láctico, málico, tartárico o cítrico.

Los derivados funcionales, metabolitos, ésteres y sales funcionan del mismo modo que la tilvalosina, es decir, que tienen un efecto similar sobre una infección viral en particular.

En especial se prefiere que la invención se relacione con el uso de tilvalosina, o de un éster o de una sal de la misma, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección de un virus.

El término "infección de un virus" significa la presencia de partículas virales en un huésped. En especial, significa la presencia en un sujeto de partículas virales no habitualmente halladas en el huésped, o de partículas virales que son patogénicas o que causan enfermedad en el huésped.

La prevención de una infección de un virus significa que se produce una reducción en la cantidad de partículas virales en un huésped, o la reducción o la prevención de la replicación de las partículas virales en el huésped, o la reducción o prevención de los efectos citopáticos de la reproducción del virus, o la reducción o prevención de la entrada del virus en el citoplasma celular, o la reducción o prevención de los efectos patológicos o de los signos/síntomas de la infección viral, en comparación con el estado esperado en un huésped no tratado tras su exposición al virus.

Un huésped no tratado es un huésped que no ha recibido la medicación preparada de conformidad con la invención.

El estado esperado es la cantidad probable de partículas virales, o el nivel de efectos citopáticos, o de efectos patológicos o de signos /síntomas en un huésped no tratado tras la exposición al virus. Una persona versada en el arte podría predecirlo.

El tratamiento de la infección de un virus significa que se produce una reducción en la cantidad de partículas virales en un huésped, o la reducción o la prevención de la replicación de las partículas virales en el huésped, o la reducción o prevención del efecto citopático de la reproducción del virus, o la reducción o prevención de la entrada del virus en el citoplasma celular, o la reducción o prevención de los efectos patológicos o de los signos/síntomas clínicos de la infección viral, en comparación con el estado previo al tratamiento.

Cuando se produce una reducción en la cantidad de partículas virales en un huésped, o la reducción de la replicación de las partículas virales en el huésped, o la reducción del efecto citopático de la reproducción del virus, o la reducción de la entrada del virus en el citoplasma celular, o la reducción de los efectos patológicos o de los signos/síntomas clínicos de la infección viral, la reducción preferentemente es estadísticamente significativa. Por ejemplo, preferentemente se produce una reducción de al menos 25%, más preferentemente de al menos 30%, aún más preferentemente de al menos 35%, más preferentemente de todo de al menos 40%.

Un huésped es un organismo superior, cuyas células son utilizadas por el virus para su replicación. El huésped puede ser humano o animal. Se prefiere que el huésped sea un animal, en especial un animal de ganado tal como vacas, caballos, aves o cerdos. En especial se prefiere que el huésped sea un cerdo. Como alternativa, el huésped

es preferentemente un ser humano.

El virus es preferentemente un virus que usa la vía endosomal o lisosomal para infectar las células del huésped.

5 Los términos “vía endosomal” y “vía lisosomal” son bien conocidos en el arte, y se refieren a los mecanismos empleados por algunos virus para ingresar a las células. Todos los virus deben tener formas de penetrar las células objetivo para iniciar la replicación. Por lo general, los virus lo hacen de dos formas: ya sea mediante un mecanismo directo en la membrana plasmática de las células, o tras la internalización en un compartimiento celular tal como un endosoma o un lisosoma. Los virus que usan endosomas y lisosomas para ingresar a la célula también deben fusionarse con o penetrar la membrana endosomal o lisosomal para poder llegar al citoplasma celular.

Un endosoma es un orgánulo que porta material recientemente ingerido mediante endocitosis. El término es bien conocido en el arte.

15 Un lisosoma es un orgánulo que contiene enzimas degradativas. El término es bien conocido en el arte.

Muchos virus que utilizan la vía endosomal o lisosomal requieren un pH específico para poder sufrir un cambio conformacional que provoque la fusión con la membrana endosomal y la entrada a la célula.

20 Sin apearse a ninguna teoría en particular, los inventores están convencidos de que la tilvalosina ingresa a las células y se concentra en los endosomas y los lisosomas, y afecta el pH en estos endosomas y lisosomas. Los inventores consideran que este cambio en el pH endosomal o lisosomal evita la fusión de las partículas virales dentro del endosoma o lisosoma con la membrana endosomal o lisosomal, y en consecuencia, evita que el virus penetre el citoplasma celular y se replique.

25 El virus es preferentemente un virus que utiliza la vía endosomal tardía o la vía lisosomal.

Un endosoma tardío es un orgánulo prelisosomal. El término “tardío” se refiere al tiempo que tarda la entrega de moléculas que sufrieron endocitosis al endosoma tardío. Los endosomas tardíos son más esféricos que los endosomas tempranos, y se ubican cerca de los núcleos. Los endosomas tardíos tienen un pH más ácido que los endosomas tempranos. El término “endosoma tardío” es bien conocido en el arte.

El virus es preferentemente un virus que utiliza una vía endosomal o lisosomal controlada por Rab7.

35 Las proteínas Rab son GTPasas pequeñas halladas en la superficie citoplásmica de ciertos compartimientos celulares. Participan en la regulación del tráfico que atraviesa la membrana de dichos compartimientos. Rab7 tiene una función en la regulación del tráfico en los endosomas tardíos y los lisosomas.

40 El virus es preferentemente un virus que requiere un pH dentro del endosoma o lisosoma inferior a 6,5, preferentemente inferior a 6, más preferentemente inferior a 5,5, aún más preferentemente inferior a 5, más preferentemente de todo inferior a 4,5.

45 El pH del endosoma o lisosoma puede medirse usando tintura sensible a pH, por ejemplo, una con fluorescencia azul con pH neutro, y amarillo/verde con pH bajo. La razón de azul:amarillo aporta una medición del pH endosomal/lisosomal (Diwu, Chen, Zhang, Klaubert & Haughland (1999) Chemistry and Biology Vol 6 Issue 7 411-418).

50 Generalmente se sabe si un virus use las vías endosoma les o lisosoma les para lograr la entrada a la célula. En el caso improbable de que no se sepa, una persona versada en el arte puede confirmar si un virus usa la vía endosomal o lisosomal, verificar qué parte de la vía se utiliza, o confirmar el pH o la dependencia de proteína Rab mediante el análisis de la entrada viral a las células en presencia de compuestos que se sabe que alteran el pH endosomal o lisosomal, o mediante el uso de mutantes que son negativas para una proteína Rab en particular. Por ejemplo, pueden usarse los siguientes inhibidores químicos:

- 55 • Cloroquina y cloruro de amonio, que elevan el pH endosomal actuando como sumidero de los protones; y
- Nocodazol, que despolimeriza los microtúbulos y bloquea la transición de los endosomas de tempranos a tardíos.

Si un virus no logra penetrar una célula en presencia de cloroquina o cloruro de amonio, puede considerarse que depende del pH, o sea, que requiere un pH ácido para infectar las células. Si el nocodazol evita que un virus infecte las células, puede considerarse que el virus utiliza la vía endosomal tardía para entrar a las células: su entrada a estas vías está bloqueada por el nocodazol.

Como alternativa, pueden usarse las siguientes mutantes dominantes negativas:

- 65 • Mutante S34N de rab5, que bloquea la transición de alveolos recubiertos en clatrina en la membrana plasmática a endosomas tempranos, y
- Mutante T22N de rab7, que bloquea la transición de endosomas tempranos a endosomas tardíos.

Los virus inhibidos por la mutante S34N de rab5 requieren el paso a través de un endosoma temprano, a aproximadamente pH 6,5. Los virus inhibidos por la mutante T22N de rab7 requieren el paso a través de un endosoma tardío a aproximadamente pH 5.

5 El virus puede ser, por ejemplo, un virus perteneciente a cualquiera de las siguientes familias: Adenoviridae, Arteriviridae, Asfarviridae, Bunyaviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Orthomyxoviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Reoviridae, y Togaviridae.

10 Además, el virus puede ser, por ejemplo, un virus perteneciente a cualquiera de los siguientes géneros: Mastadenovirus, Arterivirus, Asfarvirus, Hantavirus, Circovirus, Coronavirus, Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus, Influenza virus A, Isavirus, Parvovirus, Enterovirus, Rhinovirus, Ortoreovirus, Rotavirus, y Alphavirus.

15 In particular, el término "virus" puede significar cualquiera o más de uno o cualquier combinación de adenovirus 7, PRRSV, influenza, incluyendo influenza humana, aviaria, porcina, equina, bovina y canina, virus de anemia infecciosa del salmón, fiebre porcina clásica, virus Hepatitis C, virus Hepatitis E, virus de fiebre porcina africana, virus Puumala, virus de bronquitis infecciosa, gastroenteritis transmisible, SARS CoV, virus de Marburgo, virus del ébola, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la diarrea viral bovina, parvovirus canino, Coxsackie B3, Coxsackie B5, reovirus aviario, rotavirus, virus del bosque de Semliki y circovirus porcino tipo 2.

20 El virus es preferentemente PRRSV.

Como alternativa el virus preferentemente no es PRRSV.

25 En otra alternativa, el virus es preferentemente influenza, en especial influenza humana, en especial influenza humana cepa A o B, y en especial, cepa A.

Los datos de los virus preferidos se detallan en la Tabla 6.

30 Asimismo, la invención provee el uso de tilvalosina o de un derivado funcional, metabolito, éster o sal de la misma en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cualquiera o más de una, incluyendo cualquier combinación, de adenovirus 7, PRRSV, influenza, incluyendo gripe humana, aviaria, porcina, equina, bovina y canina, virus de anemia infecciosa del salmón, fiebre porcina clásica, virus Hepatitis C, virus Hepatitis E, virus de fiebre porcina africana, virus Puumala, virus de bronquitis infecciosa, gastroenteritis transmisible, SARS CoV, virus de Marburgo, virus del ébola, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la diarrea viral bovina, parvovirus canino, Coxsackie B3, Coxsackie B5, reovirus aviario, rotavirus, virus del bosque de Semliki y circovirus porcino tipo 2.

40 Adicionalmente, la invención provee el uso de tilvalosina, o de un derivado funcional, metabolito, éster o sal de la misma, en la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una infección de un virus como los que se define aquí, y la prevención o tratamiento de una infección bacteriana.

45 La prevención o tratamiento de una infección de un virus puede ser simultánea, posterior o anterior a la prevención o tratamiento de una infección bacteriana.

50 El término "infección bacteriana" significa la presencia de bacterias en un huésped. En especial, significa la presencia en un sujeto de bacterias no habitualmente halladas en el huésped, o de bacterias que son patogénicas o que causan enfermedad en el huésped, o la presencia de bacterias en un lugar del huésped en el cual normalmente no se encuentran estas bacterias.

55 La prevención de una infección bacteriana significa que se produce una reducción en la cantidad de bacterias en un huésped, o la reducción o la prevención de la replicación de las bacterias en el huésped, o la reducción o prevención de los efectos patológicos o de los signos/síntomas clínicos de la infección bacteriana, en comparación con el estado esperado en un huésped no tratado tras su exposición a las bacterias.

Un huésped no tratado es un huésped que no ha recibido la medicación preparada de conformidad con la invención.

60 El estado esperado es la cantidad probable de bacterias, o el nivel de efectos patológicos o de signos /síntomas clínicos en un huésped no tratado tras su exposición a las bacterias. Una persona versada en el arte podría predecirlo

65 El tratamiento de la infección bacteriana significa que se produce una reducción en la cantidad de bacterias en un huésped, o la reducción o la prevención de la replicación de las bacterias en el huésped, o la reducción o la prevención de efectos los patológicos o de los signos/síntomas clínicos de la infección bacteriana, en comparación con el estado previo al tratamiento.

La infección bacteriana puede ser cualquier infección que sea susceptible al tratamiento con tilvalosina o un metabolito funcional, derivado, éster o sal de la misma. En especial, la infección bacteriana puede ser una infección de una o más de las siguientes bacterias:

- 5 Especies de micoplasmas (*M. hyoneumoníae*, *M. hyosynoviae*, *M. hyorhinis*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, *M. bovis*, *M. bovirhinis*) *Ornithobacterium rhinotracheale*
- Bordetella bronchiseptica*
- Actinobacillus pleuroneumoníae*
- Pasteurella multocida*
- 10 *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*
- Rhodococcus (Corynebacterium) equi*
- Streptococci (Strep, suis, Strep, pyogenes,)*
- Staphylococci (Staph, aureus, Staph, epidermidis,)*
- Brachyspira hyodysenteria*
- 15 *Brachyspira pilosicoli*
- Lawsonia intracellularis*
- Clostridium perfringens*
- (Especies de *Clostridium*)
- Corynebacterium diphtheriae*
- 20 *Aerococcus catalasicus*
- Alcaligenes viscolactis*
- Micrococcus luteus*
- Microbacterium flavum*
- Bacillus subtilis*
- 25 *Bacillus circulans*
- Bacillus licheniformis*
- Rickettsia* spp
- Chlamydia* spp
- Listeria* spp
- 30 *Erysipelothrix rhusiopathiae*
- Bartonella henselae*
- Helicobacter pylori*
- Streptococcus agalactiae*, *Strep, uberis*
- Fusobacterium necrophorum*
- 35 *Leptospira* spp

La infección bacteriana es preferentemente una infección de especies de micoplasmas, en especial *Mycoplasma hyoneumoníae*.

- 40 A menudo se observa una serie de infecciones virales en combinación con otras infecciones virales y/o infecciones bacterianas, y es de especial utilidad poder usar un solo medicamento para tratar a más de una de las infecciones. Por ejemplo, una de las enfermedades con mayor importancia económica en la producción porcina a nivel comercial es la enfermedad conocida como el Síndrome Respiratorio Porcino (PRDC), que es una enfermedad multifactorial en la que participan una serie de virus y bacterias, incluyendo PRRSV, circovirus porcino tipo 2, influenza porcina, coronavirus porcino y virus de pseudo-rabia (virus de Aujeszky), al igual que los patógenos bacterianos *Mycoplasma hyoneumoníae*, *Actinobacillus pleuroneumoníae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* y *Bordetella bronchiseptica*. Consecuentemente, cuando la infección viral es una infección de PRRSV y/o de influenza porcina, la infección bacteriana es preferentemente una infección de uno o más de los siguientes patógenos: *Mycoplasma hyoneumoníae*, *Actinobacillus pleuroneumoníae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* o *Bordetella bronchiseptica*.
- 50

En el ganado vacuno se observa un síndrome respiratorio similar asociado con virus de la diarrea bovina (BVD), parainfluenza (PIV), virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), rinotraqueítis bovina infecciosa (IBR) y *Pasteurella*. *Mycoplasma bovis* también puede exacerbar esta enfermedad.

- 55 En consecuencia, cuando la infección viral es una infección de virus de la diarrea bovina, la infección bacteriana es preferentemente una infección de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* o *Mycoplasma bovis*.

- 60 Existe una serie de virus de influenza aviaria de baja patogenicidad en las aves que se ha asociado con un nivel mucho más incrementado de enfermedad cuando *Mycoplasma gallisepticum* también está presente. Se ha observado mortalidad y morbilidad elevada en las bandadas afectadas por estas dos infecciones.

En consecuencia, cuando la infección viral es una infección de influenza aviaria, la infección bacteriana es preferentemente una infección de *Mycoplasma gallisepticum*

65

La infección de virus de influenza en un ser humano puede predisponer a esa persona a infecciones bacterianas secundarias tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococci haemolyticus*, *Pneumococci*, *Pseudomanoas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*.

5 En consecuencia, cuando la infección viral es una infección de influenza humana, la infección bacteriana es preferentemente una infección de uno o más de los siguientes patógenos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococci haemolyticus*, *Pneumococci*, *Pseudomanoas aeruginosa*, y *Haemophilus influenzae*.

10 *Mycoplasma neumoníae* es una causa común de enfermedad respiratoria y se han informado co-infecciones del virus influenza y el virus sincitial respiratorio, y el hecho de que puede producirse una superinfección de *M.neumoncan* durante un brote de influenza.

15 Por tanto, como alternativa, cuando la infección viral es una infección de influenza, la infección bacteriana es preferentemente una infección de *Mycoplasma neumoníae*.

También se revela un método para prevenir o tratar una infección viral que comprende la administración de tilvalosina o de un derivado funcional, metabolito, éster o sal de la misma, o de un compuesto farmacéutico que conste de tilvalosina o de un derivado funcional, metabolito, éster o sal de la misma, a un sujeto que padezca una infección viral.

20 El método también puede usarse para el tratamiento o la prevención simultáneos de una infección bacteriana.

Una composición farmacéutica para usar en el método de la invención consta de tilvalosina o de un derivado funcional, metabolito, éster o sal de la misma con cualquier base, adyuvante o vehículo farmacéutico aceptable. Las bases, adyuvantes o vehículos farmacéuticos que pueden usarse en la composición farmacéutica incluyen, sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicerina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas glicéridas parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sale o electrolitos, tales como sulfato de protamina, disodio hidrógeno fosfato, potasio hidrógeno fosfato, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, pirrolidona polivinílica, sustancias a base de celulosa, polietilenoglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno- polioxipropileno, polietilenoglicol y grasa de lana.

35 La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, parenteral, por vaporizador de inhalación, por vía rectal, nasal, bucal, vaginal, tópica, transdérmica o a través de una reserva implantada. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier base, adyuvante o vehículo farmacéutico aceptable no tóxico.

El término "parenteral" aquí utilizado incluye inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinoval, intrasternal, intratecal, intralesional e intracraneana o técnicas de infusión.

40 La composición farmacéutica puede ser en la forma de una preparación inyectable estéril, por ejemplo, como una suspensión acuosa u oleaginosas inyectable. Esta suspensión puede estar formulada conforme a técnicas conocidas en el arte utilizando agentes de dispersión o humedecimiento adecuados (tal como, por ejemplo, Tween 80) y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable y no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanediol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se empan aceites no volátiles estériles como medio de disolución o suspensión. Para este fin puede emplearse cualquier aceite no volátil blando, incluyendo mono- y diglicéridos. Los aceites grasos, tales como el ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, como también los son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de castor, en especial en sus versiones polioxietiladas. Las soluciones o suspensiones de estos aceites pueden también contener un alcohol diluyente de cadena larga, o un dispersante tal como Ph. Helv o un alcohol similar.

55 La composición farmacéutica puede administrarse por vía oral en cualquier dosis oral aceptable incluyendo, sin limitación, cápsulas, comprimidos, y suspensiones y soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos de uso oral, las bases comúnmente usadas incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como el estearato de magnesio, también son añadidos típicos. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz desecado. Para la administración oral de las suspensiones acuosas, los componentes activos se mezclan con agentes de emulsificación y suspensión. Si se lo desea, puede añadirse ciertos agentes endulzantes y/o saborizantes y/o colorantes.

60 La composición farmacéutica puede administrarse en la forma de supositorios para su administración rectal. Estas composiciones pueden prepararse mediante la mezcla de un compuesto de esta invención con un excipiente no irritante adecuado, que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal, y que por lo tanto, se derrita en el recto para liberar los componentes activos. Estos materiales incluyen, sin limitación, manteca de cacao, cera de abeja, y glicoles de polietileno.

La composición farmacéutica puede administrarse mediante aerosol nasal o por inhalación. Estas composiciones se preparan conforme a técnicas bien conocidas en el arte de la formulación farmacéutica, y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otro conservador adecuado, promotores de absorción para aumentar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/u otros agentes de solubilización o dispersión conocidos en el arte.

El sujeto puede ser cualquier sujeto que padezca una infección viral. El sujeto puede ser un ser humano o un animal. Se prefiere que el huésped sea un animal, en especial un animal de ganado tal como vacas, caballos, aves o cerdos. En especial se prefiere que el huésped sea un cerdo. Como alternativa, el huésped es preferentemente un ser humano.

Ahora se describirá la invención en detalle mediante ejemplos, con referencia a las figuras, en las cuales,

La Figura 1 muestra los resultados de un ensayo para determinar la cantidad de células que están infectadas tras la exposición a PRRSV, en presencia de Aivlosin® (tilvalosina);

La Figura 2 muestra los resultados de un ensayo para determinar la cantidad de células MDCK que están infectadas tras la exposición a influenza, en presencia de Aivlosin® (tilvalosina);

La Figura 3 muestra los resultados de un ensayo para determinar la cantidad de células Caco-2 que están infectadas tras la exposición a influenza, en presencia de Aivlosin® (tilvalosina);

La Figura 4 muestra los resultados de un ensayo para determinar la cantidad de células HeLa que están infectadas tras la exposición a influenza, en presencia de Aivlosin® (tilvalosina);

La Figura 5 muestra el efecto del tiempo y la concentración en la acumulación intracelular de tilvalosina en células HRT-18, a) las células HRT-18 se incubaron con 0,5, 5 o 50 µg/mL de tilvalosina durante 4 o 24 horas. Las muestras del medio (barras blancas y gris claro) y de las células (barras negras y gris oscuro) se cosecharon por duplicado. Las concentraciones en el medio se detallan como µg tilvalosina/mL medio, mientras que las de las células se detallan como µg tilvalosina/mg células, b) Para cada muestra se calcularon las razones de las concentraciones intracelulares:extracelulares de tilvalosina (la muestra 1 en las barras negras y la muestra 2 en las barras blancas), y se las graficó;

La Figura 6 muestra la acumulación intracelular de tilvalosina, tilosina y tilmicosina en células HRT- 18, a) Las células HRT- 18 se incubaron con 10 µg/mL de cada antibiótico durante 4 o 24 horas.

Se cosecharon muestras de células por duplicado en cada punto temporal (barras blancas y negras) y se cosechó una muestra de medio (barras grises). Las concentraciones en el medio se detallan como µg macrólido/ml medio, mientras que las de las células se detallan como µg macrólido/mg células, b) se calcularon y graficaron las razones de la concentración intracelular:extracelular de cada macrólido (muestra 1 en las barras negras, y muestra 2 en las barras blancas);

La Figura 7 muestra la acumulación intracelular y el transporte transepitelial de la tilvalosina en células Caco-2 polarizadas. Las células Caco-2 se incubaron con 100 µg/mL de tilvalosina en la cámara apical (a) o basolateral (b) durante 30 (barras gris claro), 60 (barras negras), 120 (barras blancas) y 240 (barras gris oscuro) minutos. Se cosecharon muestras por duplicado de las células y del medio de cada cámara en cada uno de los puntos temporales. Las concentraciones en el medio se detallan como µg tilvalosina/ml medio, mientras que las de las células se detallan como µg tilvalosina/mg células. Se calcularon y se graficaron las razones de las concentraciones intracelulares:extracelulares de las muestras en las que la tilvalosina se añadió en la cámara apical (c) y la basolateral (d) (la muestra 1 en las barras negras y la muestra 2 en las barras blancas). Se tomaron muestras del medio de la cámara basolateral tras la administración apical (e) y la cámara apical tras la administración basolateral (f), y la concentración de tilvalosina se graficó como un porcentaje de la entrada;

La Figura 8 muestra la acumulación intracelular y el transporte transepitelial de tilvalosina, tilosina y tilmicosina en células Caco-2 polarizadas. a) Las células Caco-2 se incubaron con 10 µg/mL de tilvalosina, tilosina o tilmicosina en la cámara apical durante 30 (barras gris claro), 60 (barras negras), 120 (barras blancas) y 240 (barras gris oscuro) minutos. Se cosecharon muestras por duplicado de las células y del medio de cada cámara en cada uno de los puntos temporales. Las concentraciones en el medio se detallan como µg macrólido/ml medio, mientras que las de las células se detallan como µg macrólido/mg células, b) Se calcularon y se graficaron las razones de las concentraciones intracelulares:extracelulares de las muestras (la muestra 1 en las barras negras y la muestra 2 en las barras blancas), c) Se tomaron muestras del medio de la cámara basolateral tras la administración apical, y la concentración del antibiótico se graficó como un porcentaje de la entrada;

La Figura 9 muestra la acumulación intracelular de tilvalosina, tilosina y tilmicosina en células epiteliales renales porcinas, a) las células LLC-PK1 se incubaron con 10 µg/mL de cada antibiótico durante los tiempos indicados en la leyenda. Se cosecharon muestras por duplicado de las células y del medio en cada uno de los puntos temporales (barras grises para las muestras de 32 minutos, barras blancas para las de 75 minutos y barras negras para las de 120 minutos). Las concentraciones en el medio se detallan como µg macrólido/mL medio, mientras que las de las células se detallan como µg macrólido/mg células, b) Se calcularon y se graficaron las razones de las concentraciones intracelulares: extracelulares de cada macrólido (barras grises para las muestras de 32 minutos, barras blancas para las de 75 minutos y barras negras para las de 120 minutos);

La Figura 10 muestra la acumulación celular de antibióticos macrólidos en glóbulos blancos de cerdo y pollo, a) Los glóbulos blancos de cerdo se incubaron con 10 µg/mL de tilvalosina o tilosina durante 10 o 20 minutos. Las células cargadas de macrólido al cabo de 20 minutos de incubación se transfirieron al medio y se incubaron durante otros 30 minutos. Se cosecharon muestras por duplicado de las células y del medio en cada uno de los

puntos temporales (barras grises para 10 minutos, barras blancas para 20 minutos y barras negras para 30 minutos de lavado). Las concentraciones en el medio se detallan como μg macrólido/mL medio, mientras que las de las células se detallan como μg macrólido/mg células, b) Se calcularon y se graficaron las razones de las concentraciones intracelulares:extracelulares de cada macrólido (barras grises para 10 minutos y barras blancas para 20 minutos). c) Se evaluó la cantidad de macrólido remanente en la célula tras el período de reposo, y se calculó y graficó el % de retención en la célula (barras negras para las muestras con un reposo de 30 minutos), d) Los glóbulos blancos de pollo se incubaron con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tilvalosina, tilosina o tilmicosina durante 15, 30 o 60 minutos. Se cosecharon muestras por duplicado de las células y del medio en cada uno de los puntos temporales (barras grises para 15 minutos, barras blancas para 30 minutos y barras negras para 60 minutos). Las concentraciones en el medio se detallan como μg macrólido/mL medio, mientras que las de las células se detallan como μg macrólido/mg células, e) Se calcularon y se graficaron las razones de las concentraciones intracelulares:extracelulares de cada macrólido (barras grises para 15 minutos, barras blancas para 30 minutos y barras negras para 60 minutos).

La Figura 11 muestra el efecto de Aivlosin® (tilvalosina), tilmicosina y tilosina sobre la infección de un virus influenza en células MDCK.

La Figura 12 muestra los efectos de Aivlosin® (tilvalosina) en la propagación de PRRSV tras la infección.

La Figura 13 muestra el efecto de diversas sustancias químicas (clorpromazina, cloroquina, citocalasina D, nocodazol) y Aivlosin® (tilvalosina) en PRRSV.

La Figura 14 muestra el efecto de diversas dosis de cloroquina en la replicación de PRRSV, EAV (virus de arteritis equina) y FCV (calicivirus felino)

La Figura 15 muestra los efectos de Aivlosin® (tilvalosina) en el virus Influenza (cepa Udorn)

a) porcentaje de células infectadas por el virus en la monocapa celular

b) ensayo de placa empleado para cuantificar el título viral en células pretratadas con Aivlosin® (tilvalosina) o no tratadas. La replicación del virus PRRSV está inhibida en las monocapas celulares tratadas, y sólo se detecta un inóculo viral residual.

La Figura 16 muestra el efecto de diversos macrólidos en la replicación de VR2332 (una cepa americana tipo 1 de PRRSV)

La Figura 17 muestra los resultados de un ensayo sobre la entrada de VR2332.

La Figura 18 muestra el efecto de tilvalosina en la infección de virus en células HeLa y HT29.

La Figura 19 muestra los resultados de un ensayo con naranja de acridina para evaluar el efecto de la tilvalosina en el pH endosomal.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Ensayo con PRRSV

Células MA 104 se pretrataron con Aivlosin® (tilvalosina) o tilmicosina durante cuatro horas. A continuación, las células fueron expuestas a PRRSV en presencia de tilvalosina o tilmicosina, y luego se lavaron tres veces con PBS para eliminar el virus no ligado, y se añadió un medio fresco con contenido de tilvalosina o tilmicosina. Las células se incubaron durante otras 24 horas antes de ser fijadas con formaldehído al 4 %. La infección de virus fue detectada mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos primarios policlonales porcinos anti-PRRSV y anticuerpos secundarios antiporcinos marcados con FITC. La inmunofluorescencia se detectó utilizando un microscopio confocal Leica. Las células que mostraron una fluorescencia verde (de la tinción de FITC) se clasificaron como positivas conforme a los núcleos con tinción DAPI.

EJEMPLO 2

Ensayos con Influenza

Se añadió Tilvalosina a células MDCK, HeLa o CaCo-2 durante 2 o 4 horas con diversas concentraciones. A continuación las células fueron expuestas a la cepa PR8 del virus influenza A (multiplicidad de infección de 10). Trascorridas 4 horas las células se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron para detectar nucleoproteína (NP) de influenza utilizando anticuerpos primarios anti-NP de conejo y anticuerpos secundarios anticonejo con Alexa Fluor 488. La inmunofluorescencia se detectó utilizando un microscopio confocal Leica. Las células que mostraron fluorescencia verde (de la tinción con Alexa Fluor 488) se clasificaron como positivas conforme a los núcleos con tinción DAPI.

EJEMPLO 3

Comparación de la acumulación intracelular y el transporte transepitelial de Aivlosin, Tilosina and Tilmicosina

Se puso a prueba la capacidad de los antibióticos macrólidos tilvalosina, tilmicosina y tilosina de entrar y acumularse en tres tipos de células: epiteliales (intestino, riñón) y glóbulos blancos. La tilvalosina (3 -acetil4-isovaleriltilosina) ingresó con rapidez en los tres tipos de células, y la mayor concentración se obtuvo en el citoplasma de los glóbulos blancos. También penetró las células epiteliales Caco-2 polarizadas ya sea a través de la superficie apical como la basolateral, para concentrarse en el interior de las células y ser transportada a la superficie opuesta. La tilosina ingresó bastante poco en todos los tipos de células, mientras que la tilmicosina mostró una capacidad intermedia para entrar y acumularse en las células. La mayor captación por parte de la tilvalosina puede estar relacionada con la presencia de un grupo isovaleril. Si bien los tres antibióticos son macrólidos, se demostró que diferían en al menos un aspecto de la distribución, pertinente a su eficacia para tratar la enfermedad clínica.

Se sabe que los antibióticos macrólidos penetran las células y se concentran en su interior. El antibiótico con base débil queda atrapado en el ambiente ácido en las células, en especial en los lisosomas (Tulkens, 1991) y también puede concentrarse en otros orgánulos intracelulares. Sin embargo, el grado de penetración y concentración intracelular varía entre los distintos macrólidos y con los distintos tipos de células (Bosnar et al., 2005, Labro, 1993). Anteriormente se ha informado que la tilmicosina se concentra en las células (Scorneaux & Shrycock, 1998a,b).

Tres antibióticos macrólidos con declaraciones de eficacia similares son la acetilisovaleriltilosina (Tilvalosina, ECO Animal Health), la tilosina (Tylan, Elanco Animal Health) y la tilmicosina (Pulmotil, Elanco Animal Health). La tilvalosina ha sido aprobada recientemente en toda la Unión Europea (UE), a través de un proceso centralizado, para el tratamiento y la prevención de neumonía enzoótica (*Mycoplasma hyoneumoniae*) en cerdos, para el tratamiento de ileitis (*Lawsonia intracellularis*) y para el tratamiento y la prevención de disentería porcina (*Brachyspira hyodysenteriae*). Se la utiliza en ciertos países fuera de la UE para el tratamiento y la prevención de micoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synovae*) en pollos. La tilmicosina se usa en cerdos para el tratamiento de neumonía causada por *Mycoplasma hyoneumoniae* y para el tratamiento de infecciones respiratorias en bandadas de pollos asociadas con *Mycoplasma gallisepticum*. La tilosina se usa para la prevención y el control de neumonía enzoótica, para la prevención y el control o tratamiento de disentería porcina y para el tratamiento y el control de *Lawsonia intracellularis*. También se usa para el control de *Mycoplasma gallisepticum* cepa S6 en pollos.

En consecuencia, los enterocitos y las células epiteliales respiratorias parecen ser los blancos de estos patógenos. Hay muchos informes sobre el efecto de los macrólidos en el sistema inmune innato o no específico (Iannaro et al., 2000; Labro, 1993; Labro, 2000; Sunazuka et al., (2003)). Los dos tipos de células fagocíticas más importantes en el cuerpo que participan en la defensa contra las enfermedades microbianas son los macrófagos y los neutrófilos (heterófilos en los pollos). Mientras que los macrófagos, derivados de los monocitos sanguíneos, son células con una vida relativamente prolongada, los neutrófilos tiene corta vida. Se sabe que ambos tipos de células son importantes para el sistema inmune innato.

Se investigó la captación y la concentración de los tres antibióticos en diversos tipos de células, con representación de enterocitos, células epiteliales y glóbulos blancos (WBC). La investigación usó líneas celulares epiteliales establecidas de intestino humano (HRT- 18 y Caco-2), ya que estos dos tipos de células retienen algunas de las propiedades de los enterocitos *in-vivo*. Las células Caco-2 pueden formar monocapas polarizadas (dado que cuentan con una superficie apical y una superficie basolateral) cuando se cultivan en una membrana semipermeable. El medio puede colocarse por encima o por debajo de la membrana semipermeable, y el transporte transepitelial de las moléculas puede estudiarse utilizando estas células. Los enterocitos participan en la captación de antibióticos del intestino (lumen intestinal). Se utilizaron células renales porcinas como ejemplo de un tipo de célula epitelial, y se usaron glóbulos blancos tanto de pollo como de cerdo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Soluciones madre del antibiótico

La tilvalosina se obtuvo como tartrato en la forma del producto soluble en agua (ECO Animal Health). El principio activo tilvalosina (3-acetil4-isovaleriltilosina) consta de 70,71% de tilvalosina granulada para la solución oral, conforme al certificado de análisis. En todo este informe, la tilvalosina se refiere al principio activo, acetilisovaleriltilosina. La tilosina, en la forma de Tylan Soluble, (ELANCO Animal Health) se usó como sal de tartrato. Se utilizó tilmicosina, en la forma de Pulmotil AC (ELANCO Animal Health). La tilmicosina deriva de un producto de fermentación de la fracción B de la tilosina.

Líneas celulares

Las células HRT-18, Caco-2 y LLC-PK1 se obtuvieron de ECACC. Las células HRT-18 se mantuvieron en medio RPMI 1640 con contenido de suero fetal bovino al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. Las células Caco-2 se mantuvieron en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2 mM L-glutamina y 100 U/mL penicilina, y 100 µg/mL streptomina. Las células LLC-PK1 se mantuvieron en Medio 199 con contenido de suero fetal bovino al 10%, 2mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomina.

Preparación de los glóbulos blancos de cerdo y de pollo

La sangre de cerdo se extrajo utilizando campanas de extracción por vacío BD revestidas en heparina (6). Se mezclaron 20 mL de sangre con 30 mL de tampón fosfato salino (PBS) en un tubo de centrifuga cónico de 50 mL. Esto se repitió para obtener tres tubos iguales. Las mezclas se centrifugaron durante 10 minutos a 2050x g. Los glóbulos blancos, junto con algunos glóbulos rojos por debajo, se cosecharon en un tubo de centrifuga cónico de 50 mL. Se añadió PBS hasta alcanzar unos 50 mL. Se realizó una solución de Percoll al 63% de la siguiente manera: 6,3 mL Percoll (Sigma), 1,0 mL 1.5 M NaCl, 2,7 mL H₂O. Se añadió 10 mL de Percoll al 63% a dos tubos de centrifuga cónicos de 50 mL. 25 mL de los glóbulos blancos resuspendidos se colocaron cuidadosamente sobre cada una de las soluciones de Percoll. Se produjo una interfaz intensa. El material se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos. Pudo verse con claridad una banda de glóbulos blancos en la interfaz de PBS/Percoll. Los glóbulos blancos se cosecharon en PBS (50 mL) y se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos. El botón celular se suspendió en medio (medio esencial mínimo de Glasgow con contenido de penicilina y estreptomycin). Se realizó un recuento de células viables utilizando azul tripan.

El mismo método de aislamiento de los glóbulos blancos de cerdo se utilizó para los glóbulos blancos de pollo, con la excepción de que se preparó y mezcló heparina (100 I.U./mL) con igual volumen de sangre entera de pollo.

Efectos del tiempo y la concentración en la acumulación intracelular de tilvalosina en células HRT-18

Las células HRT-18, en placas de cultivo de tejidos de 6 cm, se incubaron en presencia de 0,5, 5 o 50 µg/mL de tilvalosina. Al cabo de 4 horas, se retiraron de la incubadora dos placas para cada concentración de tilvalosina y dos placas sin antibiótico. Se retiró una muestra de medio (aproximadamente 1 mL), se la colocó en un tubo Eppendorf etiquetado y se la guardó a -20°C. Luego se retiró el resto del medio. Cada una de las monocapas celulares se lavó dos veces con PBS, utilizando aproximadamente 5mL para cada lavado. Se usó el émbolo de una jeringa plástica de 2 mL para ayudar a desprender las células. Se añadió PBS (500 µL) a la placa, y las células se pasaron con cuidado a este medio utilizando una micropipeta. A continuación se colocó la muestra en un tubo Eppendorf y se la centrifugó a 8000 x g en una centrifuga de mesa (Biofuge pico, Heraeus instruments) durante 13 segundos. Se forma un botón de célula obvio. Se retiró el sobrenadante utilizando una micropipeta, y el material celular se guardó a -20°C en un tubo Eppendorf etiquetado. Al cabo de aproximadamente 24 horas, las placas de cultivo de tejidos restantes se retiraron de la incubadora y se trataron de la forma descrita para las muestras a las 4 horas. Todas las muestras, incluidas las de 4 horas, a continuación se guardaron a -70°C.

Acumulación intracelular de tilvalosina, tilosina y tilmicosina en células HRT-18

Las células HRT- 18 se prepararon de la forma descrita arriba, y se usaron en el paso subcultivo 42. Las soluciones madre de antibióticos (ya sea tilvalosina, tilosina o tilmicosina) se diluyeron en el medio de desarrollo y se añadió 10 µg/mL de cada antibiótico a las monocapas celulares confluentes. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 4 horas o 24 horas. Se cosecharon los medios y las células, y se evaluó el contenido de antibiótico de la forma ya descrita.

Acumulación intracelular y transporte transepitelial en células Caco-2

Las células Caco-2 se sembraron a una densidad de 0,8 x 10⁶ células por cavidad de una placa de 6 cavidades con filtro transparente Transwell, tamaño de poro 0,4. Las células se incubaron con 2 mL de medio tanto en cámara apical como basolateral. El medio se reemplazó cada 2 días durante 10-14 días. La resistencia transepitelial se midió utilizando un aparato Millicell ERS (Millipore) en el día 7, 10 y/o 14 a fin de identificar el momento en que las células se habían polarizado. Las lecturas de > 1000 Ω fueron indicativas de células polarizadas.

Los distintos fármacos (a 100 µg/mL) se colocaron en la cámara apical o basolateral, y en diversos puntos temporales, hasta llegar a 240 minutos: el medio en el compartimiento apical y basolateral y las células se cosecharon y analizaron para determinar el contenido de macrófido.

Acumulación intracelular de tilvalosina, tilosina y tilmicosina células renales de cerdo

Las células LLC-PK1 en placas plásticas de cultivo para tejidos de 6cm² se incubaron con 10 µg/mL de los distintos macrólidos. Se cosecharon las células y el medio de la forma descrita arriba, al cabo de 30, 75 y 120 minutos.

Acumulación intracelular de tilvalosina, tilosina y tilmicosina en glóbulos blancos de cerdo y glóbulos blancos de pollo

Las células se incubaron con 10 mg/mL de cada antibiótico. Todos los tubos se colocaron en una mezcladora rotativa a 37°C. Se cosecharon muestras de supernadante y de las células en los tiempos descritos en la leyenda de la figura. Para cada antibiótico se usaron muestras por duplicado en cada punto temporal.

Análisis de muestras con contenido de tilvalosina, tilosina y tilmicosina

Todas las muestras de supernadante y de las células se transportaron congeladas (a aproximadamente -20°C) a York Bioanalytical Solutions (York, Inglaterra) para su análisis. En breve, se pesó 0,25 g de tampón (medio RPMI con contenido de 10% FCS) en un tubo de polipropileno. Se añadió un volumen de 50 µL de la solución de trabajo apropiada a las muestras de control de calidad (QC). Se añadió metanol (50 µL) a cada muestra testigo utilizada para la preparación de las referencias de calibración, las muestras de recuperación y los testigos de los reactivos. Se añadió a cada muestra un volumen de 2,5 mL de tampón fosfato 0.1 M, y se las mezcló en una mezcladora vórtex durante aproximadamente 1 minuto, y luego se las centrifugó a 3220 x g durante 10 minutos a 4°C.

Para la fase de limpieza líquido-líquido se transfirió una alícuota (100 µL) del supernadante a un tubo de polipropileno. El pH se ajustó a pH 8-8.5 mediante el añadido de 0.1 M NaOH, y se mezcló en una mezcladora vórtex. Se añadió acetato de etilo (5 mL), y tras taponar el tubo, toda la mezcla se agitó durante 10 minutos, y luego se la centrifugó a 3220 x g durante 10 minutos a 4°C.

Se añadió acetato de amonio (20 mM; pH nativo) – ácido fórmico, 1000:3, v/v (100 µL) en cada cavidad en una placa de recolección de polipropileno de 2 mL. Se transfirió una alícuota de la mezcla de acetato de etilo (100 µL) a la placa de recolección de polipropileno y se la evaporó bajo nitrógeno (40 °C) hasta haber evaporado totalmente el acetato de etilo, pero no el acetato de amonio. Se añadió metanol (100 µL) a cada cavidad, excluyendo las referencias de calibración.

A cada cavidad con referencia de calibración se añadió 100 µL de la solución de trabajo de calibración apropiada. Las muestras luego se mezclaron en una mezcladora vórtex durante al menos 10 minutos, y se sometieron a cromatografía en fase líquida con análisis espectrométrico de masa. El método indicado se aplicó a las muestras de medio (y las referencias de calibración y las muestras de control de calidad).

Para las células, se pesaron los tubos de la muestra, y se añadió 100µL de acetonitrilo. Las muestras luego se mezclaron en una mezcladora vórtex durante 10 segundos, y luego se centrifugaron a 10285 x g a 4 °C durante 5 minutos. La muestra se transfirió a un tubo de polipropileno. El tubo de la muestra original se lavó con tampón fosfato 0.1 M (1 mL). Esto se transfirió al tubo de polipropileno. Se realizó un segundo lavado de 1 mL, y luego un lavado final de 0,5 mL. El tubo de polipropileno ahora se encontraba en la misma etapa que al final de la extracción de líquido, pero con las células presentes en lugar del medio. A esto luego se aplicaron los pasos de preparación de muestra arriba descritos. Se dejaron secar los tubos de muestra originales (o sea, se permitió que se evaporara todo remanente de disolvente), y luego se volvieron a pesar para determinar el peso de las células en la muestra, a fin de permitir la determinación de la concentración por gramo de células.

RESULTADOS**Efectos del tiempo y la concentración en la acumulación intracelular de tilvalosina en células HRT-18**

Se realizaron experimentos iniciales para investigar el efecto de incrementar la concentración con el transcurso del tiempo, sobre la acumulación intracelular de tilvalosina in en la línea de células epiteliales intestinales HRT-18. Como puede verse en la Figura 5a, se produjo una rápida captación (dentro de las 4 horas) de la tilvalosina en las células HRT-18 directamente proporcional a la concentración en el medio. Las células acumularon altas concentraciones de tilvalosina – al menos 585 µg/g de células. La célula: la razón de la concentración de medio (indicada en la Figura 5b) fue de aproximadamente 1:12 para las tres concentraciones iniciales de tilvalosina en el medio. Se obtuvieron resultados similares al cabo de 24 horas de incubación. Sin embargo, las razones fueron inferiores.

Acumulación intracelular de tilvalosina, tilosina y tilmicosina en células HRT-18

Luego comparamos la acumulación intracelular de tilvalosina en células HRT-18 con la de los macrólidos relacionados tilosina y tilmicosina. Como puede verse en la Figura 6a la tilvalosina ingresó en las células epiteliales intestinales HRT-18 con mayor rapidez. Se detectó un valor promedio de 61,8 µg tilvalosina/mg células a las 4 horas mientras que sólo se detectó un promedio de 7,24 µg tilmicosina /mg células en el mismo punto temporal. A las 24 horas se halló un promedio de 57.6 µg tilvalosina/mg células y de 32,45 µg tilmicosina /mg células. En ambos puntos temporales la tilosina no entró con facilidad en las células HRT-18. Las razones intracelulares:extracelulares se detallan en la Figura 6b. Al cabo de 4 horas, la acumulación de tilvalosina produjo un valor promedio para la concentración en las células 5,13 veces superior. Sólo se concentró una muestra de tilmicosina, y esta fue 1,32 veces superior. Al cabo de 24 horas, las razones de las concentraciones medias fueron similares para la tilvalosina (5,34 veces) y la tilmicosina (4,64 veces). La incapacidad de la tilosina de entrar en las células epiteliales HRT- 18 hizo que las razones de concentración fueran inferiores a 1.

Acumulación intracelular y transporte transepitelial de tilvalosina en células Caco-2 polarizadas

Luego examinamos la acumulación intracelular de tilvalosina en otra línea de células epiteliales intestinales, Caco-2. Estas células, cuando se cultivan en bases permeabilizadas, pueden diferenciarse y polarizarse: de este modo

forman uniones estrechas entre las células, lo que resulta en la formación de una membrana apical (superior) y basolateral (laterales e inferior).

5 La Figura 7a muestra la concentración de tilvalosina en las células y el medio de las cámaras apicales y basolaterales cuando se añadió tilvalosina al medio de la cámara apical. La Figura 7b muestra resultados similares cuando se añadió tilvalosina a la cámara basolateral. La tilvalosina muestra una entrada rápida a las células Caco-2 P polarizadas. Se detectó una concentración intracelular promedio de 428 μg tilvalosina/mg células a los 30 minutos de la administración apical (barras gris claro en la Figura 7a) y de 493 μg tilvalosina/mg células tras la administración basolateral (barras gris claro en la Figura 7b). Tras la administración apical, las concentraciones de tilvalosina en las células alcanzaron un máximo (559,5 - 620 μg tilvalosina/mg células) entre 60 minutos y 120 minutos, y luego disminuyeron a 375 μg tilvalosina/mg células a los 240 minutos. Las células que habían recibido tilvalosina administrada en la cámara basolateral no alcanzaron los mismos niveles de concentración intracelular que cuando se la administró en la cámara apical. La concentración máxima promedio alcanzada fue tras 30 minutos de incubación, y luego de este período, las concentraciones intracelulares disminuyeron a 155,5 μg tilvalosina/mg células a los 240 minutos.

Las razones intracelulares:extracelulares se señalan en la Figura 7c y la 7d. Tras la administración apical (la Figura 7c) la tilvalosina con rapidez se concentró dentro de las células Caco-2 con una razón de 4,64 al cabo de 30 minutos. Esta razón alcanzó su punto máximo entre 60 minutos y 120 minutos (valor promedio de 10,23-15,58) y luego disminuyó a un valor promedio de 5,85 a los 240 minutos. La tilvalosina también demostró una concentración rápida tras la administración basolateral: se observó una razón intracelular:extracelular promedio de 7 al cabo de solo 30 minutos. Sin embargo, después de este período, la razón disminuyó a 3,57 tras 240 minutos.

También examinamos el medio en la cámara opuesta al lugar de administración (o sea, la cámara basolateral cuando la tilvalosina se añadió a la cámara apical) para investigar si la tilvalosina podría ser transportada a través de las células epiteliales polarizadas. Como puede verse en la Figuras 7e (administración apical) y 7f (administración basolateral) se detectaron niveles similares de tilvalosina en la cámara opuesta que alcanzaron niveles de 19% (Figura 7e) o 22,05% (Figura 7f) de tilvalosina en comparación con la cámara de administración al cabo de 240 minutos. El aumento en la concentración de tilvalosina en el medio de la cámara opuesta coincide con la reducción en los niveles de tilvalosina detectados dentro de las células, lo que sugiere que la reducción en las concentraciones intracelulares puede deberse al paso de la tilvalosina al medio en el lado opuesto de las células.

Acumulación intracelular y transporte transepitelial de tilvalosina, tilosina y tilmicosina en células CaCo-2

35 Se realizaron experimentos similares para comparar la acumulación intracelular y el transporte transepitelial de la tilvalosina con la tilosina y la tilmicosina, si bien sólo examinamos el efecto tras la administración apical. Como puede verse en la Figura 8a, la tilvalosina volvió a mostrar una rápida entrada y acumulación, alcanzando una concentración promedio máxima de 42,2 μg tilvalosina/mg células al cabo de 120 minutos. Como sucedió antes, la concentración intracelular de tilvalosina disminuyó en el punto temporal de 240 minutos (a un valor promedio de 34,3 μg de tilvalosina/mg células). La tilosina no entró con facilidad en las células Caco-2 células polarizadas: tras 240 minutos sólo se detectaron 1,86 μg tilosina/mg células. La tilmicosina demostró una entrada y acumulación más lenta que la tilvalosina. La concentración intracelular promedio a los 120 minutos fue de 8,6 μg tilmicosina/mg células (comparado con 42,2 μg tilvalosina/mg células en el mismo punto temporal). A los 240 minutos la tilmicosina alcanzó una concentración promedio de 16,05 μg tilmicosina/mg.

Las razones intracelulares:extracelulares en la Figura 8b señalan que la tilvalosina se concentra con rapidez en las células Caco-2 polarizadas. La tilosina no se concentró en estas células, y la tilmicosina demostró un efecto intermedio con una cinética más lenta en la concentración, pero se alcanzaron concentraciones con aumentos similares al cabo de 240 minutos (concentración 3,49 veces mayor para la tilvalosina y 2,5 veces mayor para la tilmicosina).

Los datos señalados en la Figura 8c indican un transporte más eficiente de la tilvalosina al líquido basolateral que con tilosina o tilmicosina. Después de 240 minutos de incubación con tilvalosina, la cámara basolateral contenía un promedio de 10,47% del valor de la cámara apical. Esto se compara con un valor promedio de 0,52% para la tilosina y de 1,08% para la tilmicosina.

Acumulación intracelular de tilvalosina, tilosina y tilmicosina células renales de cerdo

60 Los animales huésped típicamente tratados con tilvalosina, tilosina y tilmicosina son los cerdos y las aves. Examinamos la acumulación intracelular de estos macrólidos en la línea de células epiteliales renales porcinas LLC-PK1. Como puede verse en la Figura 9a, la tilvalosina entró y se acumuló con rapidez en las células LLC-PK1, y al cabo de 75 minutos se detectó una concentración promedio de 53,95 μg tilvalosina/mg células comparado con 2,41 μg tilosina/mg células y 4,98 μg tilmicosina/mg células. Como puede verse en la Figura 9b, la tilvalosina alcanzó una razón intracelular:extracelular máxima de 8,9 a los 120 minutos. La tilosina no se concentró en las células LLC-PK1 en absoluto, y la tilmicosina demostró una concentración 1,7 mayor a los 120 minutos.

Acumulación intracelular de tilvalosina y tilmicosina en glóbulos blancos de cerdo y de pollo

También examinamos la acumulación intracelular de los macrólidos en glóbulos blancos aislados de pollos y de cerdos. La tilvalosina ingresó con rapidez en los glóbulos blancos de cerdo (Figura 10a). Después de 10 minutos, se detectó una concentración promedio de 57,4 µg tilvalosina/mg células, comparado con 31,25 µg tilmicosina/mg células. Se detectó un escaso aumento en estos valores a los 20 minutos, cuando se detectó 61,45 µg tilvalosina/mg células y 36 µg tilmicosina/mg células. Como puede verse en la Figura 10b, la razón intracelular:extracelular promedio fue de 8,68 para la tilvalosina, comparado con 4,33 para la tilmicosina. Se hallaron razones similares para ambos antibióticos al cabo de 20 minutos. Cuando las células cargadas de antibiótico se dejaron en medio sin antibiótico, se observó un transporte hacia el exterior de la célula. La cantidad retenida dentro de la célula fue similar para ambos antibióticos a aproximadamente 14 a 15% (Figura 10c). Por lo tanto, la mayoría del antibiótico sale de las células bajo estas condiciones.

El tipo de célula equivalente al neutrófilo de los mamíferos en los pollos es el heterófilo. Se aislaron glóbulos blancos de sangre de pollo, y se evaluaron en cuanto a la acumulación de antibiótico. Los resultados, detallados en la Figura 10d, demuestran que la tilvalosina se acumula con rapidez en las células. A los 15 minutos, la concentración de tilvalosina en las células tiene un valor promedio de 89,8 µg tilvalosina/mg células, y este valor alcanzó el máximo para este ensayo de 122,9 µg tilvalosina/mg células al cabo de 60 minutos. La tilosina pudo entrar en estas células, y observó concentraciones intracelulares de tilosina que aumentaron de 10,1 µg tilosina/mg células a los 15 minutos a 32,1 µg tilosina/mg células a los 60 minutos. La tilmicosina otra vez demostró un efecto intermedio y aumentó de 37,1 µg tilmicosina/mg células a los 15 minutos a 71,3 µg tilmicosina/mg células a los 60 minutos.

Las razones intracelulares:extracelulares (Figura 10e) demostraron que a los 15 minutos la concentración intracelular de tilvalosina fue alrededor de 18 veces mayor que la concentración en el medio. Se detectó una concentración 19 veces mayor al cabo de 60 minutos. Tanto la tilmicosina como la tilosina se concentraron en las células, si bien esto varió durante el período experimental de alrededor de 4,2 a 8 veces mayor para la tilmicosina, y de 2,65 a alrededor de 4,7 para la tilosina.

DISCUSIÓN

La captación y acumulación de antibiótico en las células podría ser un factor importante que podría afectar la replicación del virus. La replicación viral se produce exclusivamente dentro de las células, ya que el virus requiere la maquinaria de la célula para su replicación. Normalmente no se espera que los antibióticos tengan efecto sobre la replicación viral. Sin embargo, en este caso se ha hallado, sorpresivamente, que Aivlosin® (tilvalosina) afecta la replicación de PRRSV e Influenza A. Los datos comparativos para la entrada a la célula de los distintos macrólidos pueden ayudar a explicar las posibles diferencias en los efectos sobre la replicación viral.

En estos estudios los inventores han investigado la captación y la acumulación intracelular de tres macrólidos - tilvalosina, tilosina y tilmicosina - en células epiteliales humanas y porcinas, y en glóbulos blancos de cerdo y de pollo (WBC), y demostraron que la tilvalosina podía entrar y concentrarse en un mayor grado que la tilosina o la tilmicosina en todos los tipos de células. Sin embargo, los datos claramente subestiman el grado de concentración intracelular debido a la presencia de medio entre las células (líquido intercelular) (Scoreaux and Shryock, 1999). Además, se ha demostrado que los macrólidos se colocan dentro de los compartimientos celulares ácidos, en especial los lisosomas (Tulkens, 1991, Carbon, 1995). Estos compartimientos constituyen una porción relativamente pequeña del volumen citosólico en las líneas de células epiteliales, y las concentraciones de antibiótico localizadas serán, por lo tanto, elevadas.

Los experimentos iniciales para estudiar la acumulación de tilvalosina en células epiteliales intestinales (HRT 18) demostraron que el antibiótico se concentra eficientemente con niveles que dependen directamente en los del medio. Los experimentos adicionales para comparar la captación y concentración de tilvalosina, tilosina y tilmicosina en células HRT- 18 y LLC-PK1 demostraron marcadas diferencias entre la conducta de cada uno, siendo la diferencia más notable que la tilosina no ingresaba con eficiencia a ninguna de las dos líneas celulares, y no se concentraba. En consecuencia, sobre la base de los datos de HRT- 18 podría esperarse que la captación en el huésped a través de las células epiteliales intestinales es menor para la tilosina que para la tilvalosina. Los datos *in vivo* (Okamoto et al, 1981) han demostrado que la administración oral de tilvalosina produce niveles sanguíneos más altos que la tilosina. Existe una marcada diferencia entre la conducta de la tilvalosina y de la tilosina, a pesar de su que sus estructuras moleculares están estrechamente vinculadas. La observación de que 3-acetiltilosina (datos no publicados) y la tilosina se comportan del mismo modo apoya la opinión de que el grupo isovaleril hidrofóbico presente en la tilvalosina (3-acetil-4"-isovaleriltilosina) es importante para su captación eficiente y posterior acumulación en los compartimientos ácidos. La tilmicosina es intermedia en lo que se refiere a la tasa de entrada/acumulación en la célula, pero los niveles finales logrados son muy similares a los de la tilvalosina. Esto puede reflejar la hidrofobicidad intermedia de la tilmicosina. Todos los valores pKa informados de los fármacos son congruentes con la protonación y la acumulación en compartimientos ácidos tales como los lisosomas. La falta de acumulación de la tilosina, incluso tras 24 horas, probablemente refleja su limitada capacidad de atravesar la membrana plasmática y las membranas de los orgánulos intracelulares.

La investigación sobre la captación y la excreción de antibióticos macrólidos utilizando células Caco-2 extendió el trabajo celular realizado con HRT- 18. Las células Caco-2 son células de adenocarcinoma colónico humano, y son células epiteliales que exhiben las características de los enterocitos maduros, incluyendo microvelocidades, uniones estrechas, enzimas tales como hidrolasas del intestino delgado, transportadores de nutrientes y proteínas

5 membranales tales como CTFR, ICAM-1, receptor de interleucina-1, receptor de interleucina-6, y receptor de alfa1-antitripsina (Varilek *et al.*, 1994, Kaiserlian *et al.*, 1991, Zweibaum *et al.*, 1983, Sood *et al.*, 1992, Molmenti *et al.*, 1993). Estos rasgos hacen que sean ideales para evaluar la capacidad de los fármacos de atravesar los epitelios de forma direccional.

10 En numerosos estudios se han empleado células polarizadas para examinar las vías de entrada y transporte de diversos tipos de moléculas, incluyendo las inmunoglobulinas y las albúminas (Ellinger *et al.*, 2001, Maples *et al.*, 1997, Antohe *et al.*, 1997). Estas células también se han usado para estudiar la entrada y liberación polarizadas de virus (Cordo *et al.*, 2005, Chu and Ng 2002, Rossen *et al.* 2001, Jarvis *et al.*, 1999).

15 Los resultados obtenidos con células Caco-2 en la presente investigación demuestran una rápida concentración de la tilvalosina a los 30 minutos (el primer punto temporal utilizado) tanto para la administración apical como la basolateral. Se obtuvieron valores similares con ambas vías de administración, lo que sugiere la existencia de mecanismos de captación similares en ambas superficies. La tilvalosina atravesó la célula para llegar a la superficie opuesta y luego pasar al medio. De este modo, el antibiótico administrado en la superficie apical pudo ser detectado

20 en el medio basal. Este efecto aumentó con el transcurso del tiempo, de modo tal que al cabo de 4 horas alrededor de 20% de la cantidad total de tilvalosina había sido transportada. Este parece ser un proceso eficiente, teniendo en cuenta la baja cantidad de células que participan en el transporte. El desplazamiento de la tilvalosina sigue una gradiente de concentración. Se desconoce el mecanismo al que esto se debe. La tilosina no se concentró a nivel intracelular en las células Caco-2, la tilmicosina demostró una conducta intermedia: no se produjo una entrada

25 rápida, pero con el tiempo el antibiótico se concentró a nivel intracelular, y una cantidad moderada cantidad fue transportada y atravesó el epitelio.

Este trabajo *in vitro* con células epiteliales intestinales sugiere que el antibiótico *in vivo* podría ser transportado desde el lumen intestinal al cuerpo, y también desde el cuerpo al lumen intestinal. Esto ha sido demostrado para los macrólidos claritromicina y azitromicina. Nightingale (1997) informó que la azitromicina se elimina por la vía hepática con cierta excreción biliar, y que también se elimina directamente, por secreción en el lumen intestinal. Se considera que esta vía transintestinal es responsable de la eliminación de 30 a 35% de la dosis total administrada. El mismo autor declaró que la claritromicina sufre eliminación hepática y renal, y también transintestinal, siendo esta responsable de la excreción de alrededor de 10% de la dosis total de este macrólido.

35 Los estudios previos han destacado el aumento en la captación y en la acumulación de macrólidos por parte de los neutrófilos y de las células de linaje monocítico/macrofágico. Nuestros datos demostraron que la tilvalosina ingresa con rapidez y se acumula en los glóbulos blancos tanto de pollo como de cerdo al cabo de sólo 10 minutos de incubación. La captación fue mayor que la observada para la tilosina o la tilmicosina. Una de las funciones principales de los neutrófilos es la fagocitosis de organismos patogénicos. Las células cargadas de antibiótico pueden tener mayor capacidad de liberar al huésped de los organismos susceptibles mediante el incremento de la capacidad de matarlos dentro de la célula. Asimismo, mediante la liberación del antibiótico en el medio inmediatamente circundante, las células permiten la producción local de altas concentraciones de antibiótico, lo que

40 posibilita la muerte de organismos extracelulares.

45 En el estudio actual, nuestra técnica permitió la comparación de la captación de tilvalosina y tilmicosina en glóbulos blancos de cerdo. La tilvalosina fue captada con rapidez por los glóbulos blancos de cerdo (cuya mayor parte son neutrófilos) y tras solamente 10 minutos de incubación se obtuvo una razón intracelular:extracelular de 9. La tilmicosina también penetró con rapidez los glóbulos blancos porcinos, si bien la concentración obtenida fue inferior (x 4). Cuando se usaron glóbulos blancos de aves, la tilvalosina alcanzó razones intracelulares:extracelulares elevadas, de aproximadamente x 18, en unos 15 minutos, que se mantuvieron. La tilosina y la tilmicosina también se concentraron, pero en menor grado.

50 Se ha demostrado que los macrólidos tienen efectos sobre el sistema inmune innato, que incluyen la reducción de la inflamación mediante un aumento en la apoptosis de los neutrófilos (Chin *et al.*, 1998), y la reducción en el reclutamiento de neutrófilos en el lugar de infección (Iano *et al.*, 2000). Estos efectos también podrían ayudar al huésped a prevenir la patología que puede asociarse con la inflamación.

60 Hay muchos mecanismos distintos para que una molécula pueda entrar en las células, incluyendo la difusión pasiva (para las moléculas solubles en lípidos) siguiendo una gradiente de concentración, el transporte activo, y la endocitosis en sus diversas formas (mediada por clatrina, mediada por caveolae, pinocitosis, macropinocitosis y fagocitosis, como lo describen Pelkmans & Helenius 2003, Stuart & Ezekowitz 2005). Se ha estudiado el ingreso de los antibióticos macrólidos en las células, pero la información es escasa. Muchos de los estudios no distinguen entre el proceso de cruce de la membrana plasmática para llegar al citosol, y el proceso de acumulación en las vesículas

65 ácidas. Es probable que la entrada al citosol sea un proceso pasivo, dependiente de la gradiente de concentración. Se ha demostrado que la captación de macrólidos es mayor con pH alcalino. Esto confirma la opinión de que está

favorecida la difusión pasiva de moléculas no cargadas. La acumulación de macrólidos no se produce a 4°C, lo que posiblemente ocurre porque las bombas de protones que acidifican los endosomas y los lisosomas no están activas a esta temperatura, y no porque se produce una inhibición de un proceso activo en el plasma, pero la observación de que la azitromicina se concentra incluso en células pretratadas con inhibidores metabólicos (Gladue & Snider, 1990) sugiere que un gradiente de pH preexistente sería suficiente para permitir la acumulación de macrólido en los endosomas y los lisosomas. El efecto de la baja temperatura puede entonces deberse a una disipación de un pH bajo en estos orgánulos o, más probablemente, a una reorganización de la estructura de la membrana plasmática que desacelera la difusión en mayor grado que el que podría predecirse a causa del efecto normal de la temperatura en las tasas de difusión. La capacidad de las moléculas de atravesar las membranas en ausencia de canales o transportadores específicos depende mucho de su capacidad de "disolverse" en la fase lípida de la membrana. Por ende, la hidrofobicidad probablemente sea el determinante clave de la eficiencia de la entrada y la acumulación del macrólido, lo que también está afectado por los valores pKa en algunos casos. Las propiedades de la tilvalosina informadas en este artículo son congruentes con su inclusión de un grupo isovaleril y pKa de 7,6.

Las cuestiones que rodean la relación entre la actividad antibacteriana y la acumulación celular eficiente son complejas. Carbon (1995) declaró que es muy difícil predecir, para un tipo dado de célula y un tipo dado de infección intracelular, las concentraciones intracelulares reales que se necesitan para que un fármaco antimicrobiano pueda tener efecto *in vivo*. Una consideración clave, sin embargo, es la relación espacial entre la bacteria y la célula en la que se acumula el antibiótico. Tres tipos de interacción son de interés especial en el contexto de macrólidos tales como tilvalosina, tilosina y tilmicosina. El primero se relaciona con las bacterias intracelulares capaces de sobrevivir en el ambiente de pH bajo del endosoma/fagolisosoma. En este caso, la acumulación del fármaco en el compartimiento ácido lo haría altamente eficaz. El segundo tipo de interacción se relaciona con el escape de una vesícula al citosol. En este caso, la acumulación de antibiótico en la vesícula sólo tendría relevancia antes del escape de la bacteria, pero el material acumulado en la vesícula puede suministrar una reserva de antibiótico para liberar en el citosol. La tercera forma de interacción se relaciona con la estrecha interacción extracelular en la que una bacteria típicamente se une a la membrana plasmática de la célula "huésped". También en este caso, la acumulación sólo será de relevancia si la célula actúa como una reserva del fármaco que se libera lentamente en el medio que la rodea. Las propiedades de la tilvalosina descritas en este artículo son congruentes con la eficacia contra las bacterias que tienen cualquier de estos tipos de relaciones con las células.

El problema para extrapolar las propiedades *in vitro* está ilustrado por las experiencias con otros macrólidos con acumulación eficiente y relativamente hidrofóbicos. Así, si bien la captación celular de azitromicina es relativamente alta, con una captación más lenta que la de otros macrólidos, no se observa un incremento paralelo en su eficacia (Labro, 1996). De manera semejante, se han informado razones intracelulares:extracelulares elevadas para la tilmicosina (Scoreaux and Shryock, 1998a,b, 1999), pero la eficacia no es excepcional, en especial con la dosis comercial utilizada, como lo demuestran Reeve- Johnson *et al.*, (1997a,b) para la micoplasmosis en pollos. Podría esperarse que este antibiótico, que se encuentra en altas concentraciones intracelulares y atraviesa la membrana celular con relativa facilidad, fuera altamente eficaz contra, por ejemplo, micoplasma. Queda por determinarse qué rasgos de la molécula de 3'acetil4'isovaleriltilosina son responsables de su eficacia especial contra una gama de patógenos importantes asociados con las células.

Nuestros resultados con células epiteliales de cerdo (PK) dieron resultados similares a los obtenidos con las células humanas (HRT- 18, Caco-2). De hecho, los resultados fueron muy marcados, y una vez más la tilvalosina se concentró con rapidez en las células, mientras que la tilosina no se concentró, y la tilmicosina demostró propiedades intermedias.

De este modo, los datos presentados en este estudio indican diferencias marcadas en la captación celular de las moléculas de macrólido, si bien la tilmicosina deriva de la fracción B de la tilosina y la tilvalosina deriva de la fracción A. 3'acetil4'isovaleriltilosina se diferencia de 3'acetiltilosina (3AT) debido a que tiene el grupo isovaleril. La capacidad de la tilvalosina de penetrar con rapidez las células parece deberse al grupo isovaleril, demostrada en los datos de este estudio y de un estudio anterior (Tsuchiya *et al.*, 1981) que sugirió que la tilvalosina es más lipofílica que la tilosina o que 3AT. 3AT es el metabolito principal de la tilvalosina, y se genera dentro de la célula. Presumiblemente, el metabolito cuenta con una menor capacidad de salir de la célula, en comparación con la tilvalosina. El hecho de que 3AT sigue siendo metabólicamente activo y que probablemente pueda permanecer en la célula por tiempo más prolongado que la molécula progenitora podría tener una ventaja clínica.

EJEMPLO 4

Adicionalmente al ejemplo 1, se llevaron a cabo experimentos para investigar el efecto de la tilvalosina en la infección de influenza equina cepa Miami (en comparación con las cepas humanas PR8 y Udorn) en células MDCK. Las células MDCK fueron pretratadas con 1 µg/ml tilvalosina, tilosina, o tilmicosina durante 4 horas. Las células luego se infectaron con PR8, Udorn o Miami (con una multiplicidad de infección de 10) en presencia de los fármacos. Las células se fijaron a las 4 horas de la infección, y la infección se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta a la nucleoproteína de influenza. Los resultados se detallan en la Figura 11.

La tilvalosina (a 1 µg/ml) inhibió la infección de influenza equina cepa Miami en células MDCK en un 92%, la de Udorn en un 76% e inhibió por completo la infección de PR8.

EJEMPLO 5

Se realizaron experimentos para estudiar el efecto de la tilvalosina, la tilosina, y la tilmicosina en la infección de PRRSV y la propagación celular tras la infección de baja multiplicidad, y también el efecto de añadir los fármacos tras la infección.

Se infectaron células MA104 con PRRSV a una multiplicidad de infección de 0,01 (debe infectar aproximadamente 10% de las células en la primera ronda). 8 horas después de la infección se añadió tilvalosina, tilosina y tilmicosina a 1 µg/ml. Las células se cosecharon a las 28 horas de la infección, y la infección se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta. Los resultados que muestran el número de células virus-positivas para cada tratamiento se detallan en la Figura 12.

Como ya se señaló, una multiplicidad de infección de 0,01 debe infectar aproximadamente 10% de las células. Sin embargo, al cabo de 28 horas el virus tiene que haber completado una ronda de infección e infectado a las células vecinas. Hemos hallado que pueden detectarse antígenos virales en niveles bajos 10 horas después de la infección. Esta lectura aumenta a las 16-20 horas de la infección, y a las 24 horas pueden detectarse bajos niveles de expresión en las células vecinas.

El añadido de fármacos 8 horas después de la infección no debe de tener efecto en la infección primaria (o sea, ningún efecto sobre la entrada del virus en cuestión). Sin embargo, podría afectar la replicación viral directa o indirectamente a través de otros mecanismos, y también podría afectar la entrada del virus durante la ronda de infección secundaria, cuando el virus producido por las células inicialmente infectadas infecta las células en la vecindad.

El añadido de Aivlosin® (tilvalosina) 8 horas después de la infección inhibió la infección de PRRSV, reduciendo la infección a 1 % de células virus-positivas. Aivlosin® (tilvalosina) pareció inhibir la replicación viral (se detectaron menos células infectadas), previno la propagación del virus a las células vecinas, y redujo el efecto de espectador observado en las células no tratadas/infectadas, mediante el cual las células vecinas que no muestran expresión antigénica viral se unen.

EJEMPLO 6

Se realizaron experimentos para determinar si la tilvalosina tiene efecto en el virus de arteritis equina (EAV). Los inventores hallaron que la infección de EAV no fue bloqueada ni por tilvalosina ni por nocodazol, lo que sugiere que EAV no se traslada a los endosomas tardíos.

EJEMPLO 7**Estudios para investigar el efecto de inhibidores conocidos de la infección de PRRSV añadidos en diversos puntos temporales antes y después de la infección**

Añadidos 4 horas antes de la infección, clorpromazina, cloroquina, nocodazol, citocalasina D y Aivlosin® (tilvalosina) inhibieron la infección inicial de PRRSV, y por lo tanto, no se observó propagación.

Añadidos al momento de la infección, clorpromazina, cloroquina, citocalasina D y tilvalosina inhibieron la infección inicial de PRRSV, y por lo tanto, no se observó propagación. El nocodazol no inhibió la infección inicial. Las células tratadas con nocodazol de todos modos produjeron proyecciones largas, lo que indica que su generación no depende de los microtúbulos, aunque los contengan.

Con el añadido a las 2 o 4 horas de la infección, sólo Aivlosin® (tilvalosina) inhibió la infección en el lugar de infección inicial y su propagación. Las células tratadas con clorpromazina mostraron el lugar de infección inicial, pero el fármaco pareció evitar la propagación. La nocodazol no tuvo ningún efecto sobre la infección (debido a la toxicidad, su efecto en la propagación tampoco es claro) y también se observaron proyecciones largas que contenían el virus. La citocalasina D no tuvo ningún efecto en la infección inicial, ya que se detectaron células infectadas; sin embargo, no se observó la presencia de proyecciones largas, ni tampoco pudo detectarse la propagación. Esto sugiere que las proyecciones se deben a la polimerización de actina, y que son necesarias para la propagación del virus del lugar de infección inicial. La cloroquina no tuvo ningún efecto en la infección inicial ni en la propagación del virus cuando se la añadió después de la infección.

Los resultados se detallan en la Figura 13.

EJEMPLO 8**Comparación de la sensibilidad de PRRSV, EAV y FCV a la cloroquina**

El calicivirus felino, el virus de arteritis equina y PRRSV requieren la acidificación endosomal para lograr la infección de las células del huésped. Esto ha sido demostrado al elevar el Ph endosomal con fármacos tales como la cloroquina. La cloroquina es una base débil, y eleva el pH endosomal mediante el secuestro de protones (o sea que las mayores concentraciones de cloroquina secuestran más protones y elevan el valor de pH). El efecto de aumentar las concentraciones de cloroquina se detalla en la Figura 14. Los datos muestran que se necesita concentraciones relativamente bajas de cloroquina (menos de 5µM) para inhibir la infección de PRSV, lo que sugiere que incluso una elevación moderada del pH endosomal es suficiente para inhibir la entrada del virus. La inhibición de FCV requiere altas concentraciones de cloroquina (200 µM y superiores) y EAV es inhibido por 50 µM y valores superiores. Las más elevadas concentraciones de cloroquina sugieren que es necesaria una mayor elevación del pH para inhibir FCV y EAV. Todos estos datos indican que PRRSV requiere el paso a través de los endosomas con un pH mucho más bajo (o sea, en los endosomas tardíos) que EAV o FCV (o sea, en los endosomas tempranos).

EJEMPLO 9

15 Cepa EEUU de PRRSV

Los inventores también infectaron células MAI 04 con VR2332 (una cepa EEUU de PRRSV) para investigar el efecto de la tilvalosina en la infección. Los resultados se detallan en la Figura 16

20 Las células MA 104 se preincubaron con Aivlosin®, tilvalosina, tilosina, o tilmicosina durante 4 horas, bajo las concentraciones indicadas. Las células fueron luego infectadas de VR2332 a una multiplicidad de infección de 10 en presencia de los fármacos. Las células a continuación se incubaron durante 20 horas. La infección se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta.

25 Los resultados son comparables a los obtenidos con la cepa europea previamente estudiada.

EJEMPLO 10

30 Ensayo de entrada de VR2332 (cepa EEUU de PRRSV)

Las células MA 104 fueron pretratadas con clorpromazina, cloroquina, nocodazol o citocalasina D durante 30 minutos; o tilvalosina, tilosina o tilmicosina durante 4 horas. Las células fueron luego infectadas con VR2332 a una multiplicidad de infección de 10 e incubadas hasta la mañana siguiente.

35 Los resultados detallados en la Figura 17 demuestran que la cepa EEUU de PRRSV es también sensible a la tilvalosina, pero no a la tilosina. La tilmicosina muestra una inhibición parcial con la concentración empleada.

EJEMPLO 11

40 Efecto de la tilvalosina sobre la infección viral de células HeLa o HT29: virus con alta y baja multiplicidad

El trabajo ha demostrado que las células HeLa tratadas con tilvalosina son altamente resistentes a la infección viral. Los inventores han repetido este ensayo con una serie de virus y lo han comparado con la infección viral de células HT29 (una línea celular utilizada de rutina para la infección de enterovirus). El virus se añadió con multiplicidad elevada (para investigar la entrada) y con baja multiplicidad (para estudiar la propagación del virus en la monocapa celular).

50 Las células se trataron con tilvalosina, tilosina, tilmicosina y cloroquina durante 4 horas. Luego se infectó a las células con virus a una multiplicidad de infección de 10 durante 4 horas o a una multiplicidad de infección de 0,1 durante 16 horas.

La tilvalosina inhibió la entrada del virus influenza un virus y del virus coxsackie B5. La cloroquina también inhibió la entrada de los tres virus. La tilosina y la tilmicosina no tuvieron ningún efecto. EVI1 no fue afectado por ninguno de los tratamientos.

55 La tilvalosina y la cloroquina inhibieron la infección de virus influenza y de virus coxsackie B5 a baja multiplicidad. La tilosina y la tilmicosina no tuvieron ningún efecto. Para sorpresa, EVI I fue inhibido por la tilvalosina en el ensayo de baja multiplicidad. La tilvalosina pareció inhibir la propagación del virus, ya que podían verse los sitios de infección iniciales, mediante inmunofluorescencia, pero no sitios secundarios. Los resultados se señalan en la Figura 18.

60 EJEMPLO 12

Curso temporal del virus influenza

65 Se cultivaron células MDCK en 24 placas con y sin cubreobjetos (las células cultivadas en los cubreobjetos se usan para los ensayos de inmunofluorescencia). Las células se trataron con tilvalosina a 1 µg/ml durante 4 horas. Luego

las células se infectaron con Udorn (a una multiplicidad de infección de 0,1).

Las muestras se cosecharon a las 4, 8, 16 y 24 horas.

5 La Figura 15a muestra los resultados del ensayo de inmunofluorescencia y la 15b el ensayo de placas.

En ambos ensayos, Aivlosin® (tilvalosina) inhibió la infección de la cepa Udorn de influenza durante el período de 24 horas del ensayo.

10 **EJEMPLO 13**

Ensayos con naranja de acridina

15 El naranja de acridina es una tintura que hace que las células tengan fluorescencia verde, con la excepción de los compartimientos ácidos (tales como los endosomas), que se ven de color rojo debido a la pronación de la tintura y la extinción de la fluorescencia verde. Una sustancia que aumente el pH endosomal evita la aparición de la fluorescencia roja. Se determinó el efecto de Aivlosin® y de otros antibióticos macrólidos en la tinción de los endosomas por parte del naranja de acridina en una serie de líneas celulares (véase la Fig. 19). Primero se selecciona un área de las células cultivadas en un cubreobjetos de cristal utilizando macha de DAPI. Esta tinción muestra el núcleo de la célula en color azul. Este procedimiento de selección ayuda a reducir el sesgo en los resultados. A continuación se emplearon los filtros verde y rojo en el microscopio de epifluorescencia para examinar alrededor de 20 células. Se determinó la cantidad de manchas rojas (vesículas endosomales). Se hizo un recuento de la cantidad promedio de endosomas con tinción de naranja de acridina.

25 La tilosina no tuvo demasiado efecto para aumentar el pH en los endosomas de ninguna línea celular. Aivlosin® (tilvalosina) y la tilmicosina tuvieron efectos similares en las células RAW. Sin embargo, Aivlosin® (tilvalosina) tuvo mayores efectos que la tilmicosina en las células epiteliales.

30 Estos resultados demuestran que Aivlosin® (tilvalosina) aumenta el pH en los endosomas. PRRSV requiere condiciones ácidas para la fusión y entrada al citoplasma celular. Un aumento en el pH podría evitar el proceso de fusión y la posterior entrada y propagación del virus en la célula.

EJEMPLO 14

35 **Determinación de la eficacia de la tilvalosina para el control de PRRSV**

Materiales y métodos

Diseño experimental

40 Todos los procedimientos de estudio y de cuidado de los animales fueron aprobados por y de conformidad con las pautas de la Iowa State University Institutional Committee on Animal Care and Use.

45 Se obtuvieron 68 cerdos castrados de raza cruzada de 10 a 12 días de edad de una manada seronegativa y no vacunada contra PRRSV o *Mycoplasma hyoneumoniae*, según lo instituido por el investigador principal. Todos los cerdos fueron marcados y pesados a su arribo. Los cerdos se asignaron a 4 grupos de 16 cerdos cada uno (Tabla 1). La asignación de los cerdos a los grupos fue realizada por un experto en estadísticas. Los cerdos fueron asignados a los grupos mediante aleatorización en bloque (por peso) de modo tal que el peso de los cerdos en los grupos estuviera bien equilibrado. Cada grupo se alojó por separado, pero en salas idénticas dentro de las instalaciones de aislamiento. Había comederos y bebederos con tetina en cada sala, de modo tal que los cerdos pudieran comer y beber *ad libitum* durante todo el ensayo. Se efectuó la necropsia de los cuatro cerdos sobrantes antes del Día del Ensayo 0, y no fueron incluidos en el ensayo.

50 Cada grupo de tratamiento consistió de 2 corrales con 8 cerdos cada uno. A su arribo, los cerdos recibieron una dieta medicada concentrada de uso comercial, libre de todo contaminante o pesticida conocido y con contenido de 50 gramos por tonelada de Mecadox (Philbro Animal Health). Todos los cerdos se trataron con ceftiofur hidrocloreto (Excenel®, Pfizer Inc.) conforme a las instrucciones del envase, durante 3 días a partir de su arribo.

Parámetros de producción

60 Los cerdos se pesaron individualmente a su arribo, y en los Días del Ensayo 0, 7, 14, 17, y 28 para evaluar el aumento de peso (aumento diario promedio).

Evaluación clínica

65 Los cerdos se evaluaron a diario durante 10 días para detectar signos clínicos respiratorios, incluyendo tos y aumento en las tasas respiratorias, como ya se describió¹. La puntuación fue: 0=normal, 1=disnea leve y/o taquipnea

bajo estrés; 2= disnea leve y/o taquipnea en reposo; 3=disnea moderada y/o taquipnea bajo estrés; 4=disnea moderada y/o taquipnea en reposo; 5=disnea grave y/o taquipnea bajo estrés; y 6=disnea grave y/o taquipnea en reposo. Además, se tomó nota de toda tos observada como: 0=no tose y 1 =tose. Las observaciones fueron realizadas por un veterinario o una persona cualificada.

5

Tratamiento

Tres grupos de cerdos recibieron alimento medicado con contenido de Tilvalosina en 3 concentraciones diferentes provisto por ECO Animal Health. Los cerdos en los tres grupos recibieron la dieta medicada durante todo el transcurso del ensayo desde el Día del Ensayo 0 hasta el Día del Ensayo 28. El cuarto grupo se recibió alimento idéntico pero sin medicar.

10

Ensayos con alimento

Se tomaron muestras representativas de una libra de alimento en el Día del Ensayo 17 y 28. No se tomaron muestras del alimento al inicio del ensayo. Todas las muestras se marcaron con el número de código, el lugar de muestreo, el número de protocolo, la fecha de muestreo y la firma, y se colocaron en una bolsa de plástico para congelador. El tamaño aproximado fue de 0,5 kg de alimento. Se tomaron muestras por duplicado. Un juego de muestras se envió con hielo seco a ECO Animal Health para su ensayo en el laboratorio analítico, y la muestra duplicada se mantuvo en las instalaciones.

20

Procedimiento de provocación

Una dosis de inoculación de 1×10^5 de la dosis infecciosa de cultivo de tejido (TCID)₅₀ en 2 ml de medio de una cepa muy virulenta de PRRSV, VR2385, se administró por vía intranasal a todos los cerdos.

25

Necropsia

Se efectuó la necropsia de seis cerdos de cada grupo de tratamiento en el Día del Ensayo 17 (10 días después de la infección) y la de los cerdos restantes el Día del Ensayo 28 (21 días después de la infección). En el Día del Ensayo 17, se efectuó la necropsia de dos cerdos elegidos al azar de cada corral, y las del resto de los cerdos (n=10) el Día del Ensayo 28. Se administró a los cerdos solución de eutanasia aprobada AVMA (Fatal-Plus, Vortech Pharmaceuticals, Dearborn, MI) seguido de su exsanguineación. La tráquea y los pulmones se sujetaron con un fórceps, y se extirparon del cerdo. Los pulmones se evaluaron para detectar lesiones macroscópicas congruentes con PRRSV, como ya se describió. Los frotis traqueales se tomaron asepticamente para el aislamiento bacteriano utilizando métodos microbiológicos estándar. Los pulmones se lavaron con 50 ml de tampón fosfato salino (PBS) que contenía antibióticos (9 µg de gentamicina/ml, 100 U penicilina/ml y 100 µg estreptomina/ml).

30

35

Se tomó una porción de cada lóbulo pulmonar y se la procesó para su examen histopatológico.

40

Las lesiones histopatológicas se calificaron de la forma ya descrita. En breve, 0 = sin lesiones microscópicas, 2 = neumonía intersticial multifocal moderada, 3 = neumonía intersticial difusa moderada, y 4 = neumonía intersticial grave. La inmunohistoquímica se calificó de la forma ya descrita. En breve, 0 = sin células antígeno-positivas para PRRSV, 1= 1-10 células positivas/campo, 2 = 11-30 células positivas/campo, 3 = 31-100 células positivas/campo, y 4 = >100 células positivas/campo.

45

PCR en tiempo real

La sangre para PCR se tomó en los Días del Ensayo 0, 10, 17, 21 y 28.

50

El ARN total se extrajo utilizando el equipo QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) de conformidad con las instrucciones del fabricante, y se solubilizó en 60 µl de solución de elución. Los extractos de ARN se conservaron a -80 °C hasta que se realizó la amplificación RT-PCR en tiempo real.

55

60

Los cebadores directos y la sonda empleados en la cuantificación de PRRSV es la región ORF7. La sonda se marcó con una tintura informadora fluorescente, 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo de 5', y una tintura eliminadora de fluorescencia, Black Hole Quencher 1 (BHQ_1) en el extremo de 3'. La cuantificación de PRRSV se realizó utilizando RT-PCR en tiempo real en un Rotor-Gene RG-300 (Corbett Research, Sydney, AU). La mezcla de reacción de 20 µl consistió de 10 µl 2x tampón de mezcla maestra TaqMan Universal PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA); 0,1 µl transcriptasa inversa Superscript III (200 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,2 µl RNaseout (40 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, CA); 2 µl de cebador directo y cebador inverso con concentración óptima; 0,8 µl de sonda TaqMan con concentración óptima; 2,9 µl agua libre de DNasa/RNasa, y 2 µl de diluciones de 10 veces de la referencia de ARN o 2 µl del ARN total extraído de cada muestra. La amplificación se realizó a 55 °C durante 45 minutos, 95°C durante 10 minutos; luego durante 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos, y 60 °C durante 60 segundos cada uno. La fluorescencia se midió al final de cada ronda de amplificaciones. Todas las diluciones de referencia y las muestras desconocidas se procesaron por duplicado. Se aceptaron las curvas estándar cuando los coeficientes de correlación (r^2) fueron > 0,99. La cuantificación de PRRSV se logró mediante la comparación del

65

valor de ciclo umbral (C_T) de la muestra de entrada de ARN con el valor C_T de las distintas diluciones de la referencia de ARN.

Serología

5 Sangre tomada al arribo y en los Días del Ensayo 0, 17, y 28. Los niveles de anticuerpos de PRRSV se determinaron utilizando un ensayo ELISA de disponibilidad comercial (HerdChek: PRRS; IDEXX Laboratories, Westbrook, ME).

Análisis estadístico

10 Primero se resumieron los datos (mediante medias, desviaciones estándar e histogramas) para evaluar la calidad de los datos y los supuestos de distribución. Los datos se trataron como continuos (incluyendo los promedios de las puntuaciones) o como discretos (por ej., las puntuaciones). Algunos de los datos fueron medidas repetidas a diario (temperatura y puntuación respiratoria), y se analizaron primero como un resumen de los valores de cada cerdo
15 utilizando la puntuación máxima o promedio, y luego como datos univariados. Todas las demás medidas repetidas se analizaron de forma transversal. Los datos se analizaron utilizando ANOVA, ANOVA no paramétrica de Kruskal-Wallace, o X^2 , dependiendo de los tipos de datos y su distribución. Las pruebas ómnibus estadísticamente significativas estuvieron seguidas por pruebas de pares post-hoc utilizando el ajuste HSD de Tukey (datos continuos) o el ajuste de Bonferroni (datos discretos). Una excepción fueron las variables ADG en el día 17, para las
20 cuales la prueba ómnibus fue estadísticamente significativa pero las pruebas de pares ajustadas no mostraron resultados significativos entre los grupos. Para este caso se informaron las pruebas de pares sin ajuste. Se promediaron los datos de los lóbulos pulmonares.

Resultados

Parámetros de producción

25 El rendimiento general de crecimiento de los cerdos fue evaluado mediante el peso y el aumento de peso diario (ADG) (Tabla 2). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los pesos promedios de ninguno de los cerdos en ninguno de los grupos. En el día 17, el aumento de peso diario promedio de los cerdos en el grupo 4 fue significativamente diferente comparado con el de los cerdos en el grupo 1. No se observaron otras diferencias en
30 ningún punto temporal de ensayo.

Enfermedad clínica

35 Las puntuaciones de enfermedad clínica se resumen en la Tabla 4. Las puntuaciones respiratorias clínicas y las temperaturas rectales se calificaron como el valor máximo para cada cerdo con el transcurso del tiempo, y luego se analizó el promedio de las puntuaciones máximas. Además, se analizó la media del promedio de la temperatura rectal. Para las puntuaciones respiratorias, los cerdos en los grupos 1 y 2 tuvieron puntuaciones significativamente
40 más bajas que las observadas en los grupos 3 y 4. Para las temperaturas rectales máximas, los cerdos en el grupo 3 observaron medias de las temperaturas rectales promedio significativamente más altas que todos los demás grupos. Sin embargo, no se observaron diferencias en la temperatura rectal promedio observada en cada grupo.

Puntuaciones macroscópicas, microscópicas y de inmunohistoquímica (IHC)

45 Las puntuaciones de lesiones pulmonares microscópicas se resumen en la Tabla 5. No se observaron diferencias en las puntuaciones de lesiones pulmonares macroscópicas en ninguno de los grupos. Se observó neumonía congruente con infección bacteriana en 40 de los cerdos del ensayo. Esto puede haber afectado la gravedad de la neumonía PRRSV en este ensayo.

50 Microscópicamente, los cerdos del grupo 1 tuvieron una puntuación de lesiones significativamente más baja en comparación con todos los demás grupos. No se observaron diferencias en las puntuaciones de lesiones microscópicas en la segunda necropsia.

55 Las puntuaciones de inmunohistoquímica del nódulo linfático traqueobronquial, las amígdalas y los pulmones (un promedio de 2 secciones) no mostraron diferencias estadísticas entre los grupos.

Bacteriología

60 Se aisló *Bordetella bronchiseptica* de las vías respiratorias de la mayoría de los cerdos. Además, se realizaron cultivos en una serie de animales para evaluar si había presencia de micoplasmas porcinos. De ellos, *Mycoplasma hyorhinis* se aisló en 7 de 23 cerdos.

Ensayos de PCR (RT-PCR) en tiempo real

Los resultados de RT-PCR se resumen en la Tabla 5. Se observaron diferencias en el Día del Ensayo 10, con niveles de números de copias de ARN de PRRSV significativamente más elevados en los grupos 3 y 4 en comparación con los niveles en el grupo 2. Además, el nivel de ARN de PRRSV en el grupo 4 fue significativamente superior en el mismo punto temporal comparado con el grupo 1. No se observaron otras diferencias en los niveles séricos de ARN en PRRSV en ningún momento del ensayo. No se detectó ARN de PRRSV en el Día del Ensayo 0 antes de la provocación.

Serología

Todos los cerdos eran anticuerpos séricos-negativos en el Día del Ensayo 0. En el Día del Ensayo 17, 2 cerdos en los grupos 1 y 2 y un cerdo en el grupo 3 y en el grupo 4 seguían siendo seronegativos para los anticuerpos de PRRSV. Todos los demás cerdos eran seropositivos. Todos los cerdos restantes eran seropositivos al finalizar el ensayo.

Discusión

PRRSV sigue siendo un problema significativo para la industria porcina. ECO Animal Health tenía interés en evaluar la capacidad de Aivlosin® (tilvalosina) de reducir la enfermedad clínica y la viremia asociadas con la infección de PRRSV. Se observaron diferencias en el aumento de peso diario en el Día del Ensayo 17, y en la gravedad de la enfermedad clínica medida por la puntuación respiratoria y la temperatura rectal máxima. Además, el nivel de ARN de PRRSV RNA fue diferente entre los grupos en el Día del Ensayo 10, que fue 3 días después de la inoculación de PRRSV. No se observaron otras diferencias en los niveles, pero hubo una amplia variación en los niveles de ARN medidos en cada grupo individual, lo que dificultó la interpretación de los datos. Es interesante notar que las dosis más bajas de Aivlosin® (tilvalosina) parecieron ser las más eficaces para lograr un mayor aumento de peso diario y reducir la enfermedad clínica y el nivel de viremia de PRRSV.

Se observaron menos efectos de la Tilvalosina en la neumonía inducida mediante PRRSV. No se observaron diferencias en la gravedad de la neumonía macroscópica de los cerdos, sin embargo, la neumonía de PRRSV fue bastante grave en este modelo de provocación. Al igual que con la viremia, la enfermedad clínica y el aumento de peso diario promedio, la administración de dosis más bajas de Tilvalosina pareció tener mayor eficacia para controlar la enfermedad, como pudo observarse por la reducida cantidad de lesiones microscópicas en la primera necropsia.

Este estudio demostró que la tilvalosina en dosis más bajas parece reducir la enfermedad clínica y la viremia asociada con la infección de PRRSV.

Tabla 1. Diseño experimental de cerdos infectados de PRRSV y alimentados con Aivlosin® (tilvalosina) y de controles no tratados.

Grupo	Medicamento/Provocación	Número de cerdos a los que se efectuó una necropsia - Día 10	Número de cerdos a los que se efectuó una necropsia - Día 21	Número total de cerdos
1	100ppm/PRRSV	8	8	16
2	200ppm/PRRSV	8	8	16
3	600ppm/PRRSV	8	8	16
4	0ppm/PRRSV	8	8	16
Total		32	32	64

Tabla 2. Aumento de peso diario promedio (libras) (± error estándar) de cerdos infectados de PRRSV y alimentados con Aivlosin® (tilvalosina) y de los controles no tratados.

Grupo	Días del ensayo				
	0 (Línea basal)	7	14	17*	28
1	9,4±0,3	1,57±0,9	1,5±,05	1,59±,05 A	1,42±,05
2	9,5±0,5	1,52 ±,10	1,45±,06	1,59±,07A,B	1,53±,07
3	9,6±0,5	1,83±,16	1,47±,06	1,44±,04 A,B	1,47±,06
4	9,1±0,4	1,57±,14	1,37±,06	1,40±,05 B	1,45±,05
	<i>p</i> -,93	<i>p</i> -,52	<i>p</i> -,49	<i>p</i> -,03	<i>p</i> -,51

A, B = Las medias con letra diferente dentro de una columna son estadísticamente diferentes.
 • El valor-p indica la diferencia estadística entre los grupos de tratamientos en una misma columna.

Tabla 3. Resumen de la enfermedad clínica de cerdos infectados de PRRSV y alimentados con Aivlosin ® (tilvalosina) y de los controles no tratados.

Grupo	Media de puntuación respiratoria máxima	Media de temperatura rectal máxima *	Media de temperatura rectal promedio
1	0,5±0,1 A*	104,5±0,2 A	103,6±0,1
2	0,6±0,2 A	104,7±0,2 A	103,7±0,1
3	1,8±0,3 B	105,8±0,3 B	103,8±0,1
4	1,6±0,3 B	104,9±0,2 A	103,7±0,1
	<i>P</i> <,0001	<i>p</i> =,004	<i>p</i> =,43

A, B = Las medias con letra diferente dentro de una columna son estadísticamente diferentes.
 • El valor-p indica la diferencia estadística entre los grupos de tratamientos en una misma columna.

5 **Tabla 4.** Puntuaciones medias de lesiones pulmonares PRRSV microscópicas (± error estándar) de cerdos infectados con PRRSV y alimentados con Aivlosin ® (tilvalosina) y de los controles no tratados.

Grupo	Lesiones microscópicas	
	Necropsia 1*	Necropsia 2
1	0,2±0,2 A	2,1±0,4
2	2,0±0,3 B	1,9±0,3
3	2,0±0,3 B	1,5±0,3
4	3,1±0,2 B	1,6±0,2
	<i>p</i> =0,0034	<i>p</i> =,49

A, B = Las medias con letra diferente dentro de una columna son estadísticamente diferentes.
 • El valor-p indica la diferencia estadística entre los grupos de tratamientos en una misma columna.

Tabla 5. Media de ensayo en tiempo real de reacción en cadena de polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR) (± error estándar en 0) de cerdos infectados con PRRSV y alimentados con Tilvalosina y de los controles no tratados.

Grupo	Días de ensayo				
	0	10*	17	21	28
1	ND*	15.289,88 B,C (10.376,85)	95.315,72 (39.810,62)	36.451,13 (18.412,13)	5.301,63 (4.255,46)
2	ND	19.336,8 C (14.608,2)	78.804,81 (13.955,73)	18.724,88 (8.119,57)	892,36 (205,60)
3	ND	54.487,19 A,B (21.036,27)	146.655,4 (39.291,16)	30.260,69 (12.238,41)	1.292,31 (384,53)
4	ND	88.993,13 A (62.389,83)	94.018,09 (31.455,92)	23.983,88 (7.888,66)	2.817,63 (1.777,98)
		<i>p</i> =,0016	<i>p</i> =,49	<i>p</i> =,84	<i>p</i> =,96

*ND= no detectable
 A, B = Las medias con letra diferente dentro de una columna son estadísticamente diferentes.
 • El valor-p indica la diferencia estadística entre los grupos de tratamientos en una misma columna.

10 **REFERENCIAS**

Antohe F, Serban G, Radulescu L, Simionescu M. (1997). Transcytosis of albumin in endothelial cells is brefeldin A-independent. *Endothelium*, 5:125-36.

15 Bosnar, M, Kelneric, Z., Munic, V., Erakovic, V. and Parnham, M.J. (2005) Cellular uptake and efflux of azithromycin, erythromycin, clarithromycin, telithromycin and cethromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 2372-2377.

Carbon C. (1995). Clinical relevance of intracellular and extracellular concentrations of macrolides. *Infection*, 23: S10-14.

20 Chu JJ, Ng ML. (2002). Infection of polarized epithelial cells with flavivirus West Nile: polarized entry and egress of virus occur through the apical surface. *Journal of General Virology*, 83:2427-35.

Chin AC Morck DW Merrill JK Ceri H Olon ME Read RR Dick P Buret AG (1998) Antiinflammatory benefits of tilmicosin in calves with *Pasteurella haemolytica*-infected lungs. *American Journal of Veterinary Research*, 59: 765-771

25 Cordo SM, Cesio y Acuna M, Candurra NA. (2005). Polarized entry and release of Junin virus, a New World arenavirus. *Journal of General Virology*, 86: 1475-9.

Ellinger I, Rothe A, Grill M, Fuchs R. (2001). Apical to basolateral transcytosis and apical recycling of immunoglobulin G in trophoblast-derived BeWo cells: effects of low temperature, nocodazole, and cytochalasin D. *Experimental Cell Research*, 269: 322-31.

30 Gladue R. P and Snider M. E. 1990. Intracellular accumulation of azithromycin by cultured human fibroblasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 34(6): 1056-60.

Ianaro A Ialenti A mafia P Sautebin L Rombola L Carnuccio R Iuvone T D'Acquisto F DiRosa M (2000). Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292 : 156-

163.

Halbur PG, Paul PS, Frey ML, et al. Comparison of the pathogenicity of the two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol* 1995; 32: 648-660.

5 Halbur PG, Miller LD, Paul PS, et al. Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory system virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet Pathol* 1995;32: 200-204.

Jarvis MA, Wang CE, Meyers HL, Smith PP, Corless CL, Henderson GJ, Vieira J, Britt WJ, Nelson JA. (1999). Human cytomegalovirus infection of caco-2 cells occurs at the basolateral membrane and is differentiation state dependent. *Journal of Virology*, 73:4552-60.

10 Kaiserlian D, Rigal D, Abello J, Revillard JP. (1991). Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule- 1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. *European Journal of Immunology*, 21: 2415-21.

Labro M-T (1993). Effects of macrolides on host natural defenses. In; *Macrolides chemistry, pharmacology and clinical use*. pp 389-408. Ed. Brysker A, Paris; Arnette-Blackwell.

15 Labro M-T (1996). Intracellular bioactivity of macrolides. *Clinical Microbiology and Infection*, 1: S24-30.

Labro, M-T. (2000). Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immunofairy tales"? *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 615-650.

20 Maples CJ, Ruiz WG, Apodaca G. (1997). Both microtubules and actin filaments are required for efficient postendocytotic traffic of the polymeric immunoglobulin receptor in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:6741-51.

Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:3-16.

Molmenti, EP Ziambaras T Perlmutter, DH(1993). Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:14116-14124.

25 Nightingale CH (1997). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of newer macrolides. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 16:438-443.

Okamoto R, Tsuchiya M, Nomura H, Iguchi H, Kiyoshima K, Hori S, Inui T, Sawa T Takeuchi T Umezawa H (1981). Biological properties of new acyl derivatives of tylosin. *The Journal of Antibiotics*, 33: 1309-1315.

30 Pelkmans L, Helenius A (2003). Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Current opinion in cell biology*, 15:414-22.

Reeve-Johnson, L Kempf I. Gesbert F. Guittet M (1997a). Efficacy of tilmicosin in the control of experimental *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 20: 148-149.

35 Reeve- Johnson, L Kempf I. Charleston B (1997b). An evaluation of the efficacy of tilmicosin treatment and control measure against artificial infection with *Mycoplasma gallisepticum* in chickens *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 20: 132.

Rossen JW3 Kouame J, Goedheer AJ, Vennema H, Rottier PJ. (2001). Feline and canine coronaviruses are released from the basolateral side of polarized epithelial LLC-PK1 cells expressing the recombinant feline aminopeptidase-N cDNA. *Archives of Virology*, 146:791-9.

40 Scomeaux B, Shryock TR. (1998a). Intracellular accumulation, subcellular distribution and efflux of tilmicosin in swine phagocytes. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 21:257-68.

Scorneaux B, Shryock TR. (1998b). Intracellular accumulation, subcellular distribution, and efflux of tilmicosin in chicken phagocytes. *Poultry Science* 77: 1510-21.

45 Scomeaux B, Shryock TR. (1999) . The determination of the cellular volume of avian, porcine and bovine phagocytes and bovine mammary epithelial cells and its relationship to uptake of tilmicosin. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 22:6-12.

Sood R, Bear C, Auerbach W, Reyes E, Jensen T, Kartner N, Riordan JR, Buchwald M. (1992). Regulation of CFTR expression and function during differentiation of intestinal epithelial cells. *The EMBO Journal* 11: 2487-94.

50 Stuart LM, Ezekowitz RA. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity*, 22:539-50.

Sunazuka, T., Yoshida, K., Oohori, M., Haragaya, Y., Iwai, Y., Akagawa, K.S. and Omura, S. (2003) Effects of 14-membered macrolide compounds on monocyte to macrophage differentiation. *The Journal of Antibiotics*. 56: 721-724.

55 Tsuchiya M, Suzukake K, Hori M Sawa T Takeuchi T Umezawa H. (1981) Studies on the effects of 3-acetyl-4"-isovaleryltylosin against multiple-drug resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics* 34: 305-312.

Tulkens PM (1991). Intracellular distribution and activity of antibiotics. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases* 10:100-106.

Varilek GW, Neil GA, Bishop WP. (1994). Caco-2 cells express type I interleukin-1 receptors: ligand binding enhances proliferation. *The American journal of physiology* 267:G1101-7.

60 Zweibaum A, Triadou N, Kedinger M, Augeron C, Robine-Leon S, Pinto M, Rousset M, Haffen K. (1983) Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *International journal of cancer*, 15:407-12.

ES 2 526 817 T3

Tabla 6

Familia	Género	Virus	Ejemplo huésped
Adenoviridae	Mastadenovirus	Adenovirus 7	hombre
Arteriviridae	Arterivirus	Síndrome respiratorio y reproductivo porcino	cerdo
Asfarviridae	Asfarvirus	Virus de fiebre porcina africana	cerdo
Bunyaviridae	Hantavirus	Virus Puumala	hombre
Circoviridae	Circo virus	Circovirus porcino 2	cerdo
Coronaviridae	Coronavirus	Virus de bronquitis infecciosa	ave de corral
		Virus de gastroenteritis transmisible (TGEV)	cerdo
		SARS CoV	hombre
Filoviridae	Marburgvirus	Virus de Marburgo Lago Victoria	hombre
Filoviridae	Ebolavirus	Virus ébola de Reston, Sudán, Costa de Marfil, el Zaire	hombre
Flaviviridae	Flavi virus	Virus del Nilo Occidental	hombre, caballo, aves
		virus de fiebre amarilla	hombre
		virus de la encefalitis transmitida por garrapatas	hombre
Flaviviridae	Pestivirus	Virus de diarrea bovina	ganado
		Fiebre porcina clásica	cerdo
Flaviviridae	Hepacivirus	hepatitis C	hombre
	Virus influenza		hombre, aves de corral, cerdo, caballo, perro
Orthomyxoviridae	A	Virus influenzaA, virus influenza B	perro
Orthomyxoviridae	Isavirus	Virus de anemia infecciosa del salmón	salmón
Parvoviridae	Parvovirus	parvovirus canino	perro
Picornaviridae	Entero	Coxsackie B3, B5	hombre
Picomaviridae	Rhino	Subgrupo mayor	hombre
Picomaviridae	Rhino	Subgrupo menor	hombre
Reoviridae	Orthoreo virus	Reovirus aviario	aves de corral
Reoviridae	Rotavirus	Rotavirus	hombre, oveja, cerdo, ganado
Togaviridae	Alphavirus	Virus del bosque de Semliki	hombre
		Virus hepatitis E	cerdo

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de tilvalosina, o de un derivado funcional, metabolito, éster o sal de la misma, en la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una infección de un virus, donde el derivado funcional o metabolito de la tilvalosina se selecciona a partir de 3-O-Acetil-desmicosina, 3-O-Acetiltilosina, 3,4"-di-O-Acetiltilosina, a-O-Acetil-4"-O-propioniltilosina, 3-O-Acetil-4"-O-Isovalerilmacrocin, 3-O-Acetil-4"-O-butiltilosina, 3-O-Acetil-4"-O-Isovalerilrelomicina, 4"-O-Isovaleriltilosina, 3,20-di-O-Acetil-4"-Isovalerilrelomicina y 3,4""-di-O-Acetil-4"-O-Isovaleriltilosina.
- 10 2. El uso conforme a la reivindicación 1, donde el virus es un virus que utiliza la vía endosomal o lisosomal para infectar las células del huésped.
- 15 3. El uso conforme a la reivindicación 2, donde el virus es un virus que utiliza la vía endosomal o lisosomal tardía para infectar las células del huésped.
- 20 4. El uso conforme a la reivindicación 3, donde el virus es un virus que utiliza la vía lisosomal para infectar las células del huésped.
- 25 5. El uso conforme a la reivindicación 3, donde el virus es un virus que utiliza la vía endosomal tardía para infectar las células del huésped.
- 30 6. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones de la 2 a la 5, donde el virus requiere un pH inferior a 6,5 dentro del endosoma o del lisosoma.
- 35 7. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el virus es a Mastadenovirus, un Arterivirus, un Asfarvirus, un Hantavirus, un Circovirus, un Coronavirus, un Filiovirus, un Flavivirus, un Pestivirus, un Hepacivirus, Influenza virus A, un Isavirus, un Parvovirus, un Enterovirus, un Rhinovirus, un Orthoreovirus, un Rotavirus, o un Alphavirus.
- 40 8. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el virus se selecciona a partir de adenovirus 7, PRRSV, influenza, virus de anemia infecciosa del salmón, fiebre porcina clásica, virus Hepatitis C, virus Hepatitis E, virus de fiebre porcina africana, virus Sin Nombre, virus Cuatro Esquinas, Virus Puumala, virus de bronquitis infecciosa, gastroenteritis transmisible, SARS CoV, virus del Nilo Occidental, virus de Marburgo, virus del ébola, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la diarrea bovina, parvovirus canino, Coxsackie B3, Coxsackie B5, reovirus aviario, rotavirus, virus del bosque de Semliki y circovirus porcino tipo 2.
- 45 9. El uso conforme a la reivindicación 8, donde el virus es PRRSV.
- 50 10. El uso conforme a la reivindicación 8, donde el virus es influenza.
- 55 11. El uso conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el medicamento también es para la prevención o el tratamiento de una infección bacteriana.
- 60 12. El uso conforme a la reivindicación 9 o 10, donde el medicamento es también para la prevención o el tratamiento de una infección bacteriana.
13. El uso conforme a la reivindicación 11, donde cuando la infección viral es una infección de PRRSV o de influenza porcina, la infección bacteriana es una infección de uno o más de lo siguiente: *Mycoplasma hyoneumoníae*, *Actinobacillus pleuroneumoníae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* y *Bordetella brochiseptica*.
14. El uso conforme a la reivindicación 11, donde cuando la infección viral es una infección de virus de diarrea viral bovina, la infección bacteriana es una infección de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* o *Mycoplasma bovis*.
15. El uso conforme a la reivindicación 11, donde cuando la infección viral es una infección de influenza humana, la infección bacteriana es una infección de uno o más de lo siguiente: *Staphylococcus aureus*, *Streptococci haemolyticus*, *Pneumococci*, *Pseudomanoas aeruginosa*, y *Haemophilus influenzae*.
16. El uso conforme a la reivindicación 11, donde cuando la infección viral es una infección de influenza aviaria, la infección bacteriana es una infección de *Mycoplasma gallisepticum*.

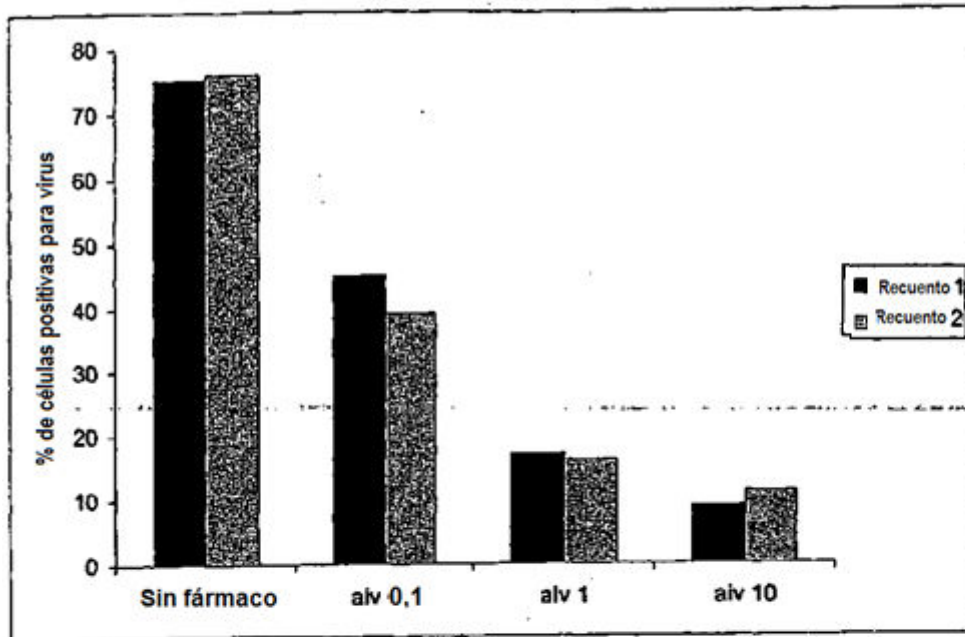


Figura 1

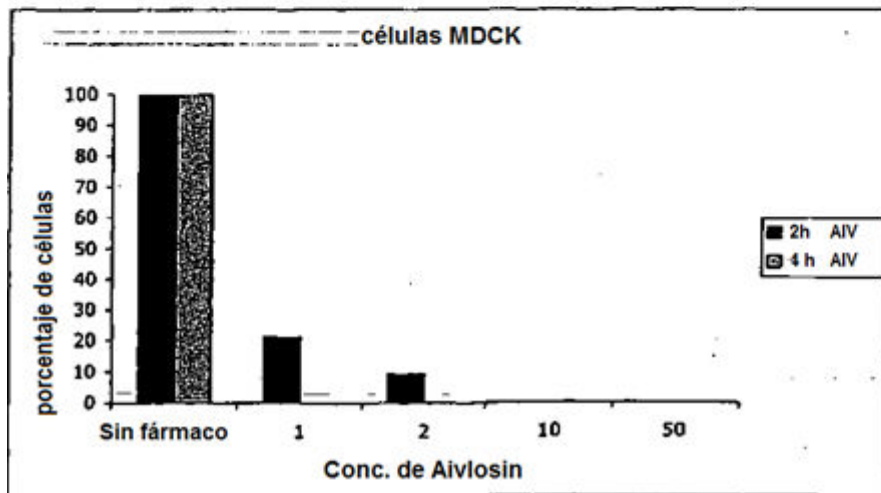


Figura 2

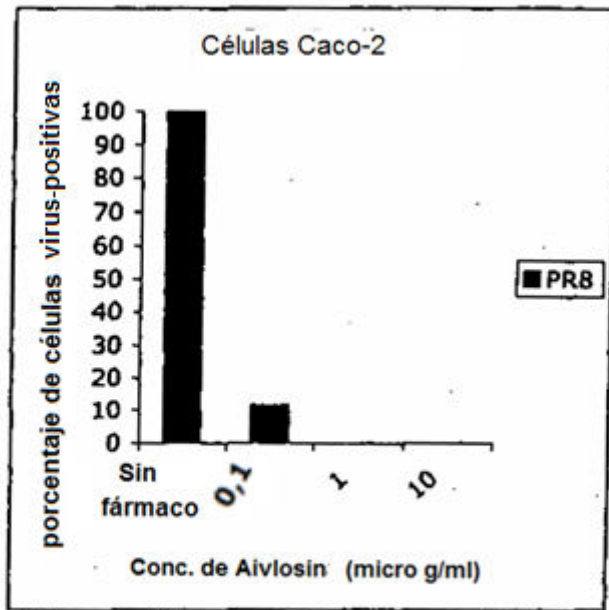


Figura 3

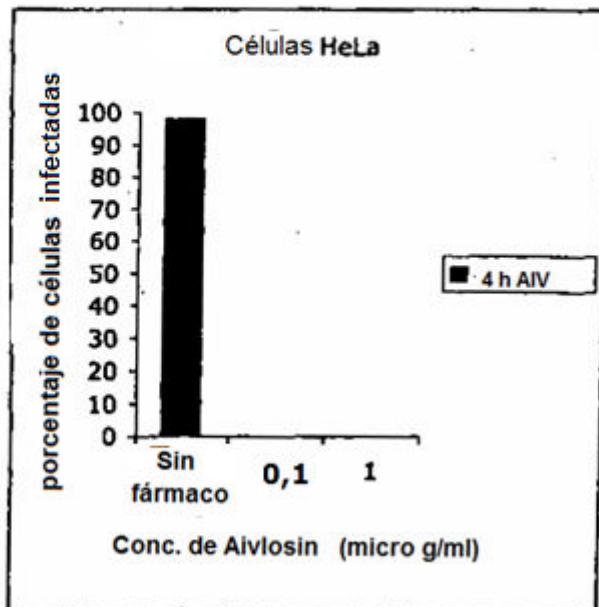


Figura 4

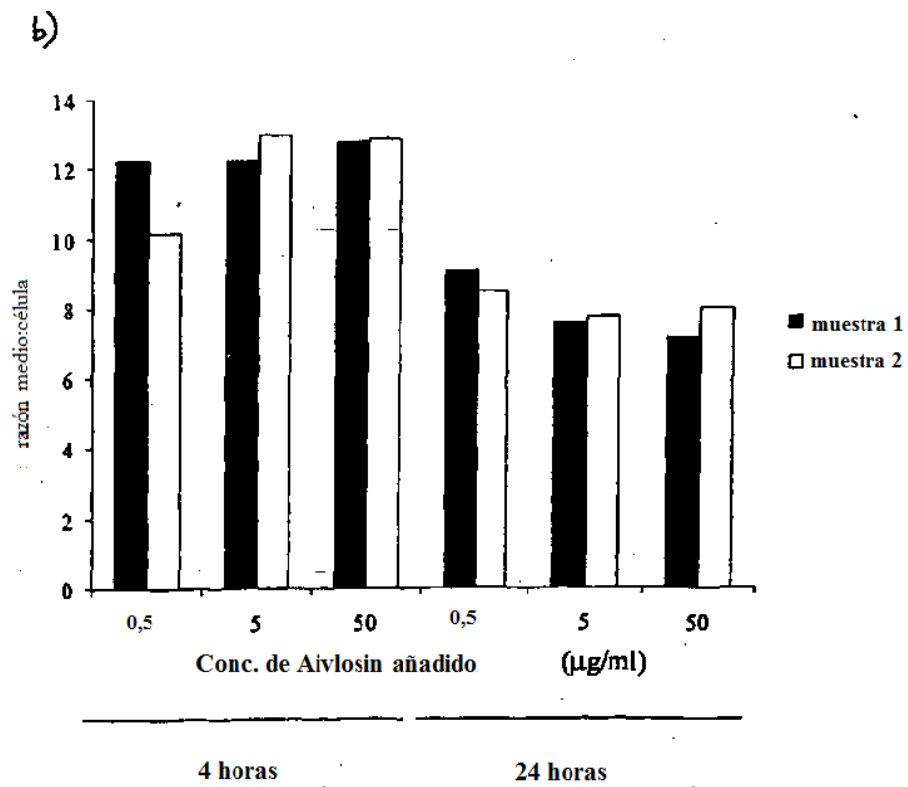
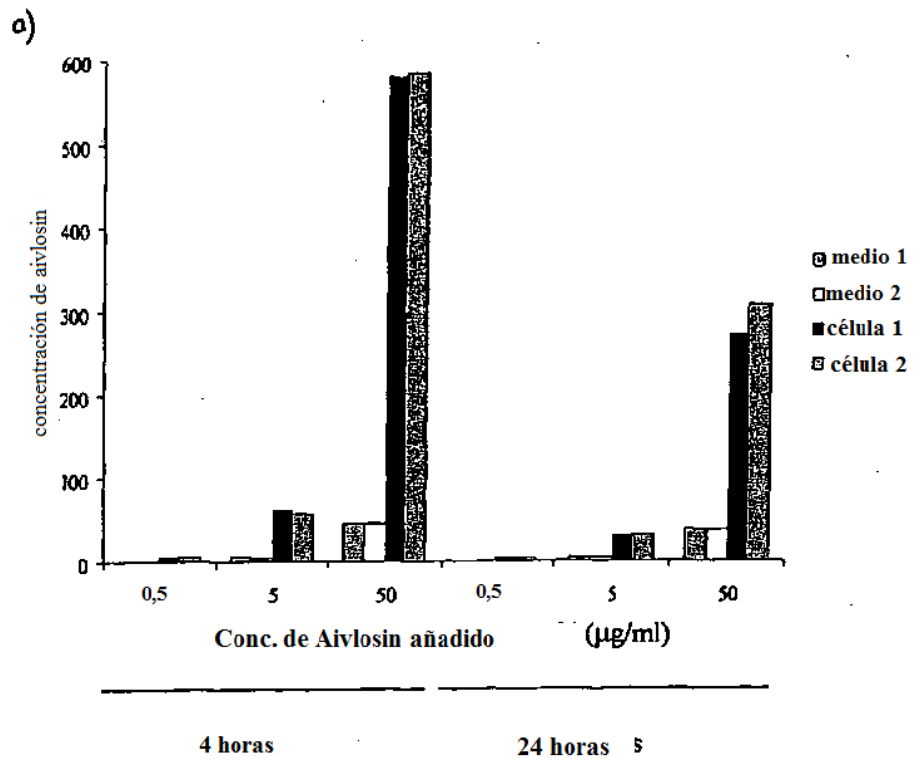


Figura 5

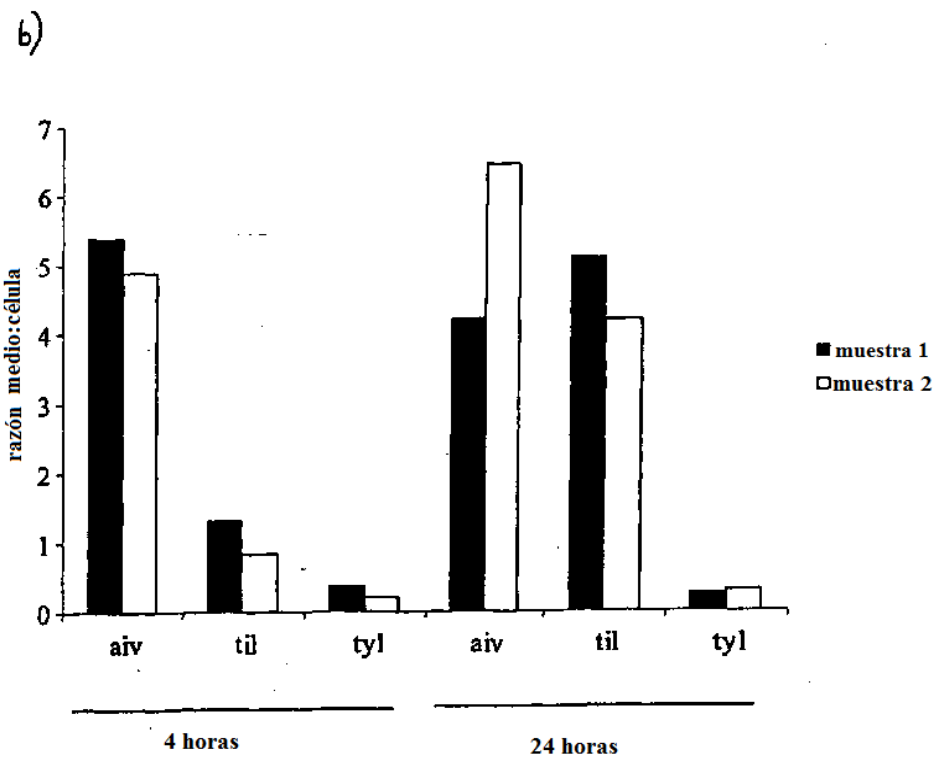
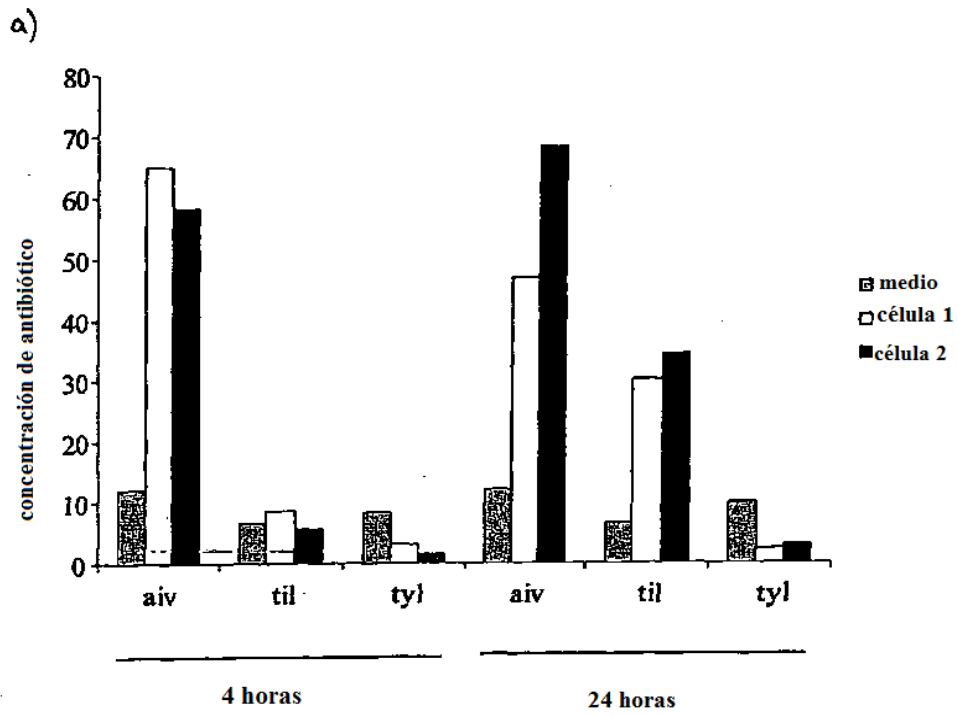


Figura 6

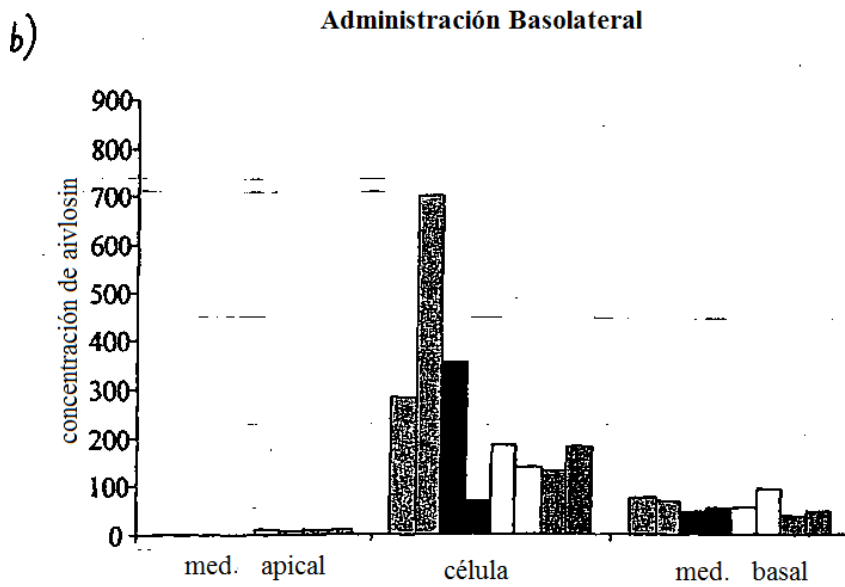
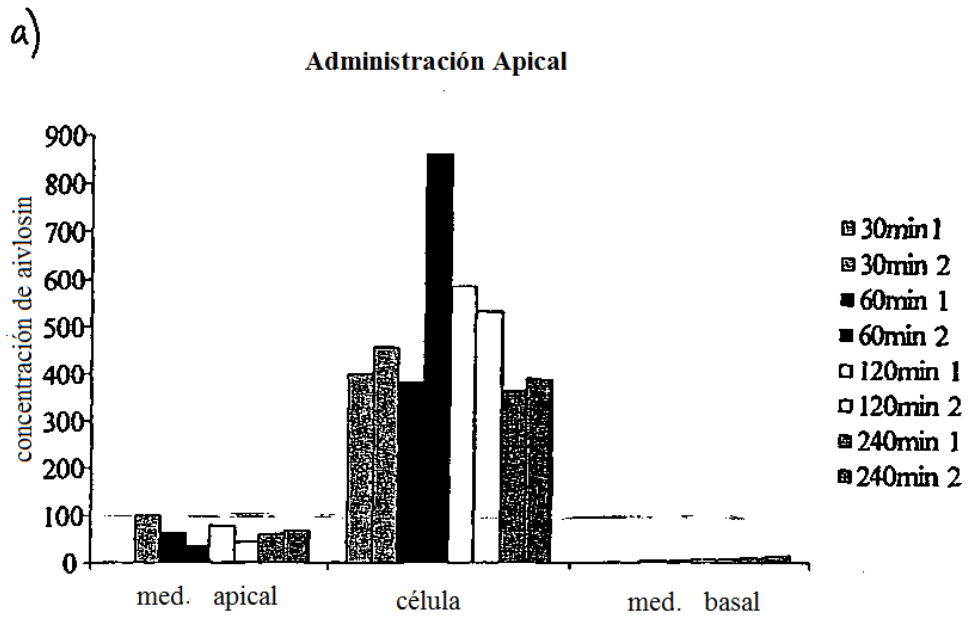


Figura 7

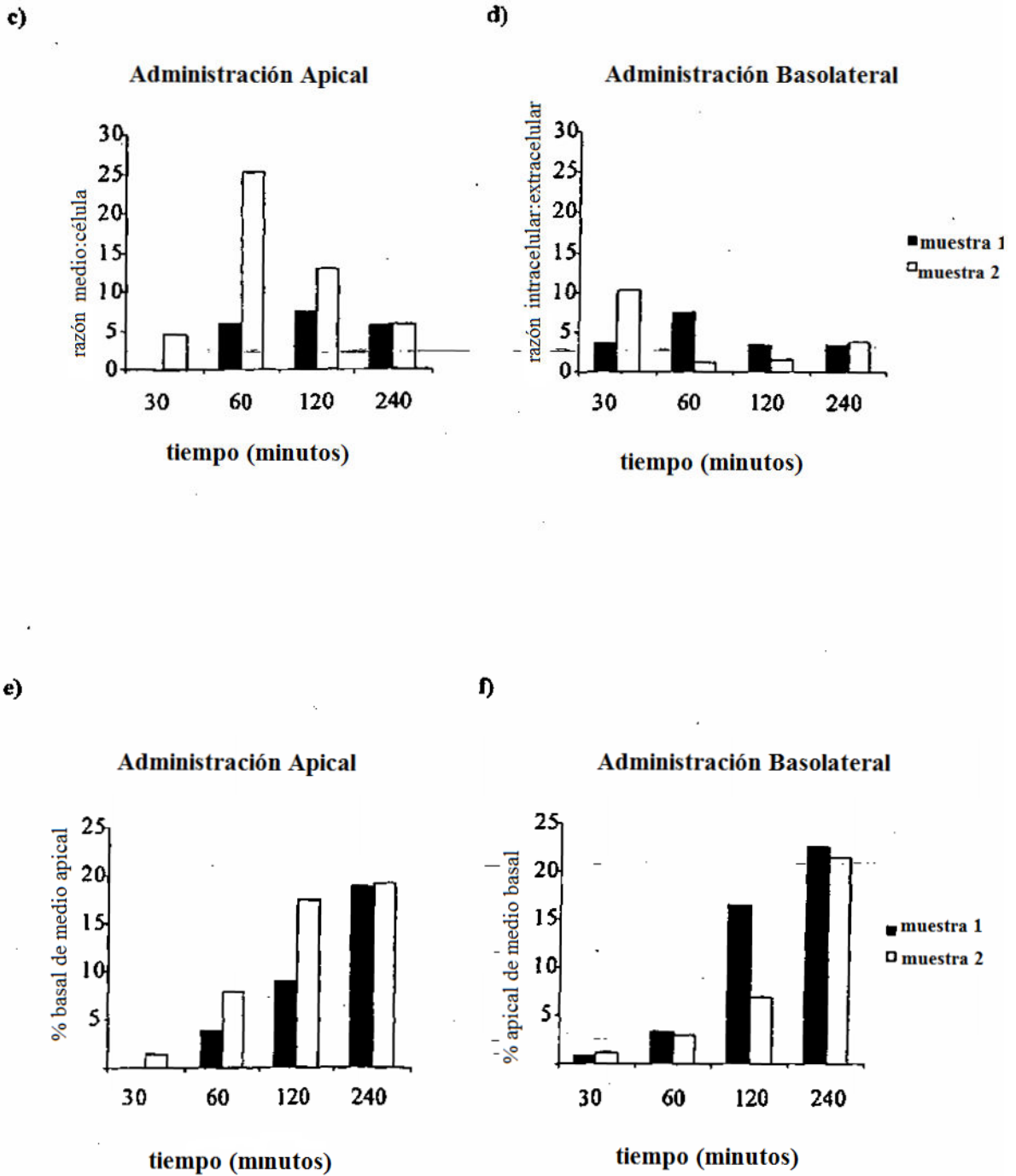


Figura 7

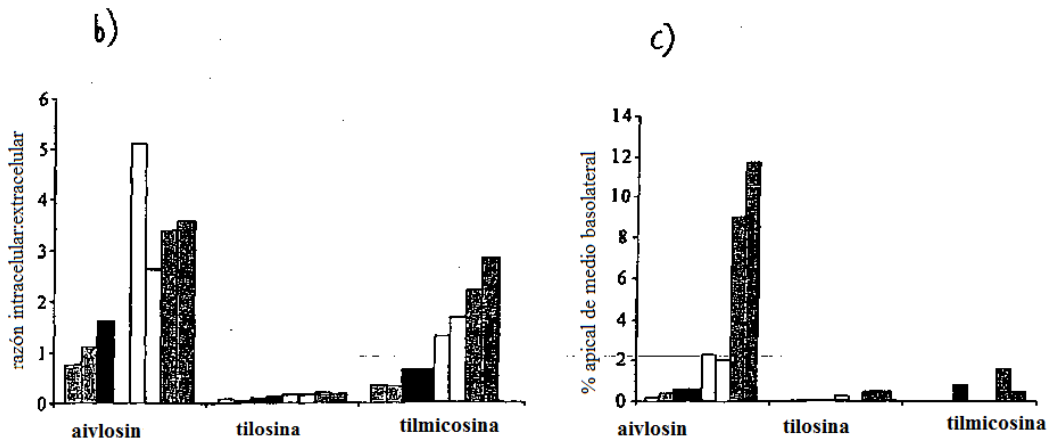
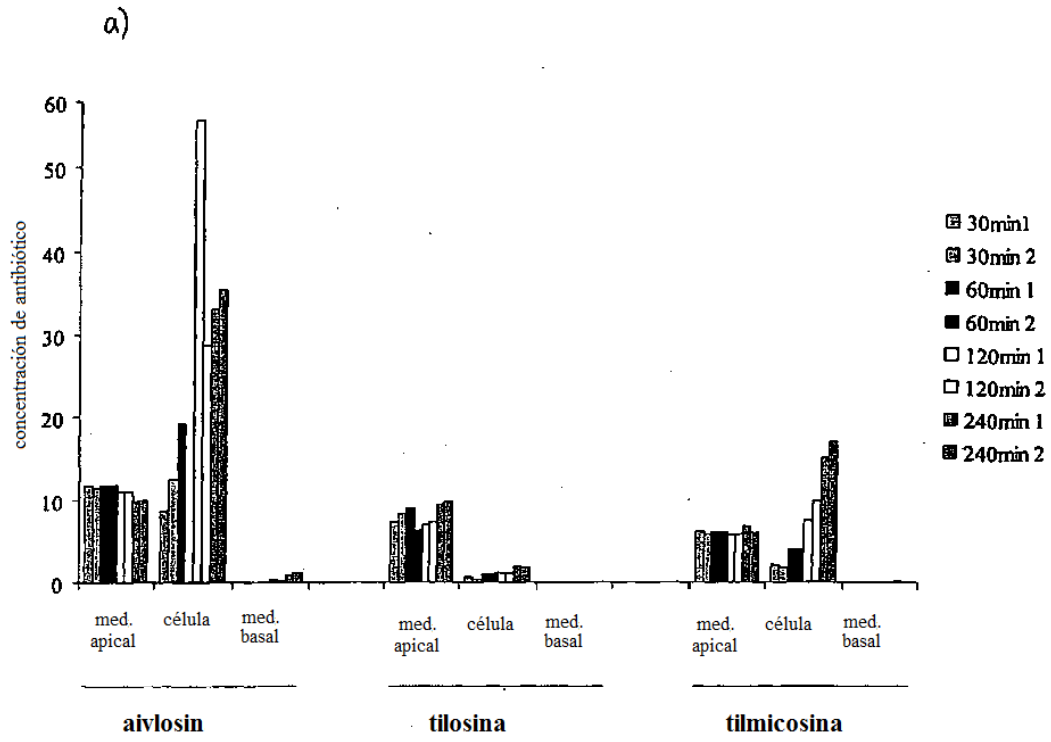


Figura 8

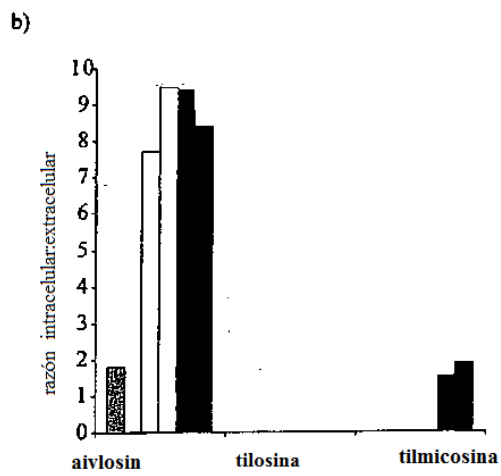
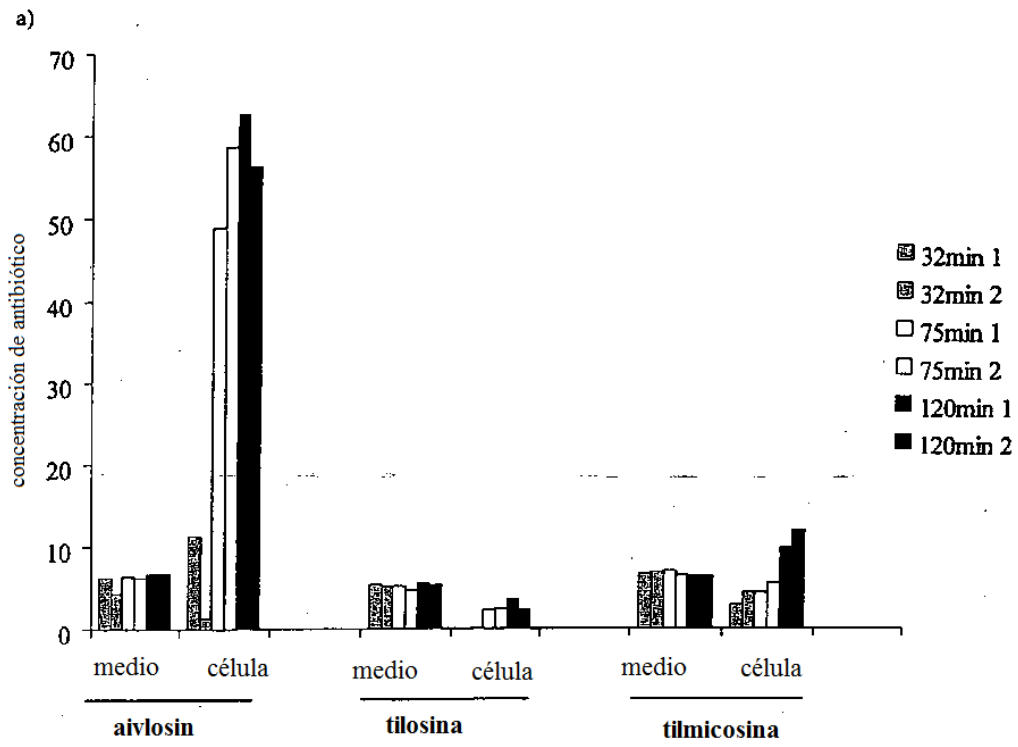
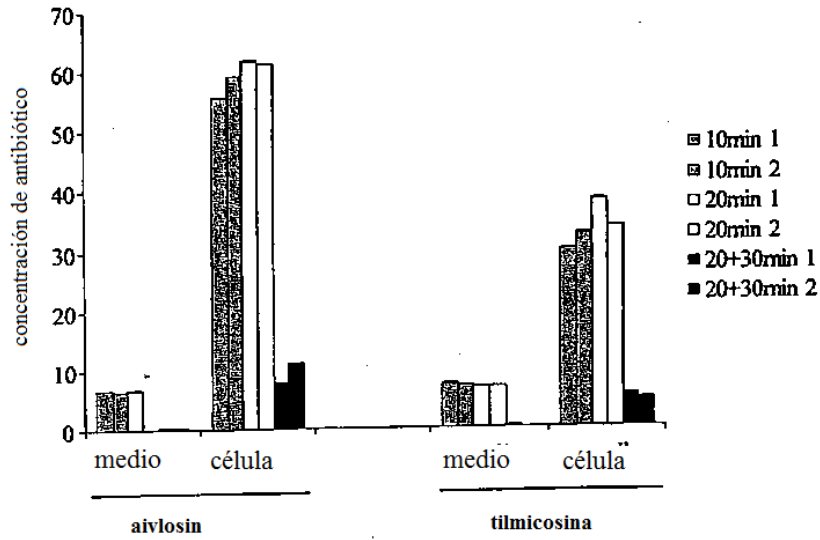
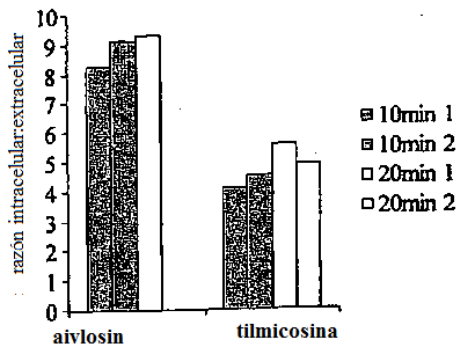


Figura 9

a)



b)



c)

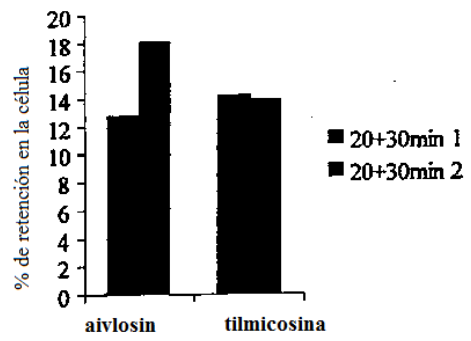
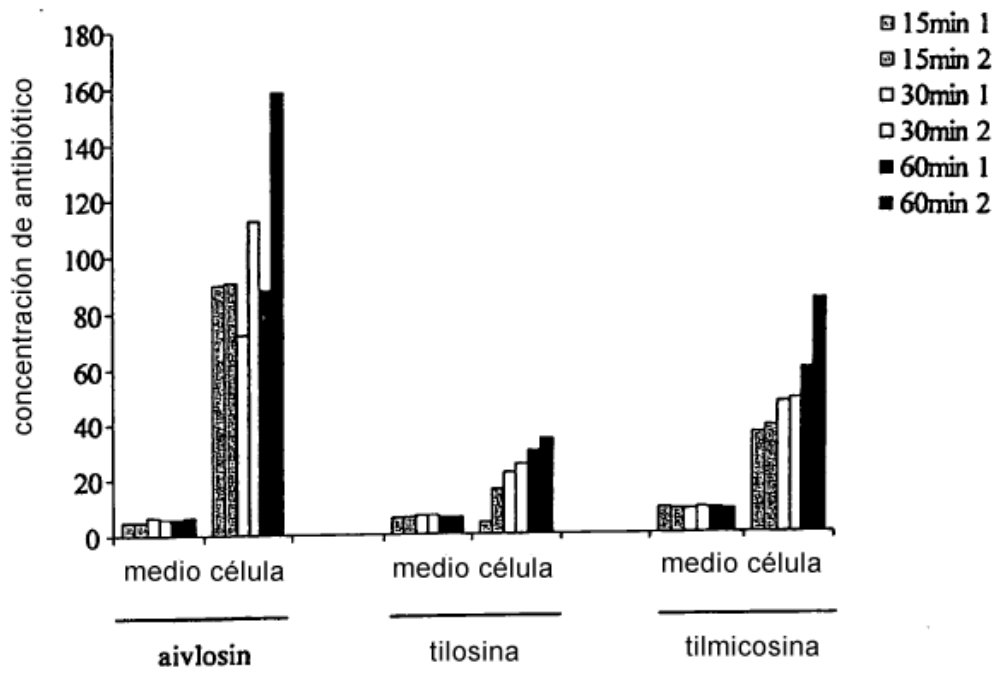


Figura 10

d)



e)

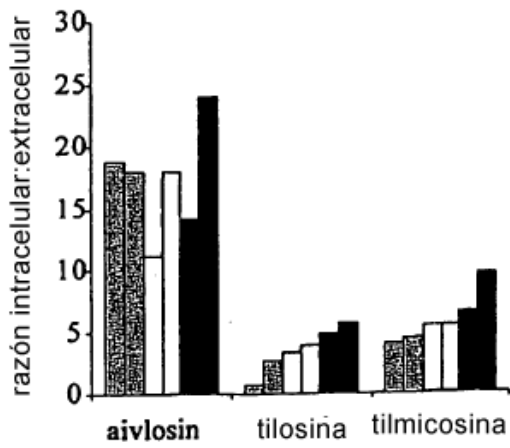


Figura 10

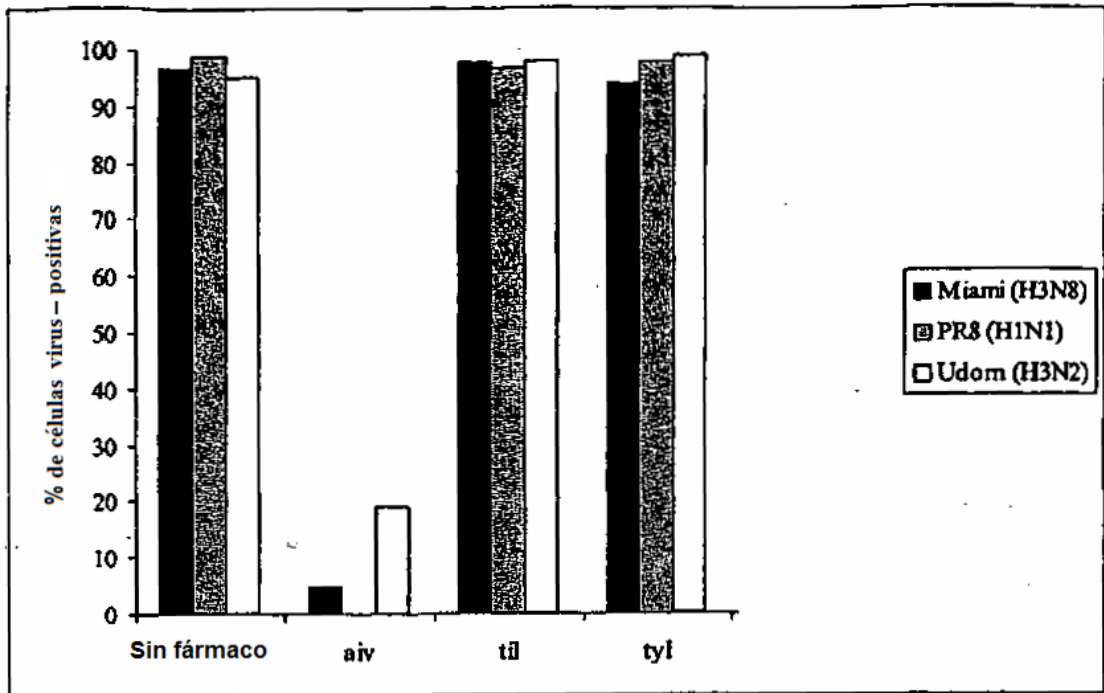


Figura 11

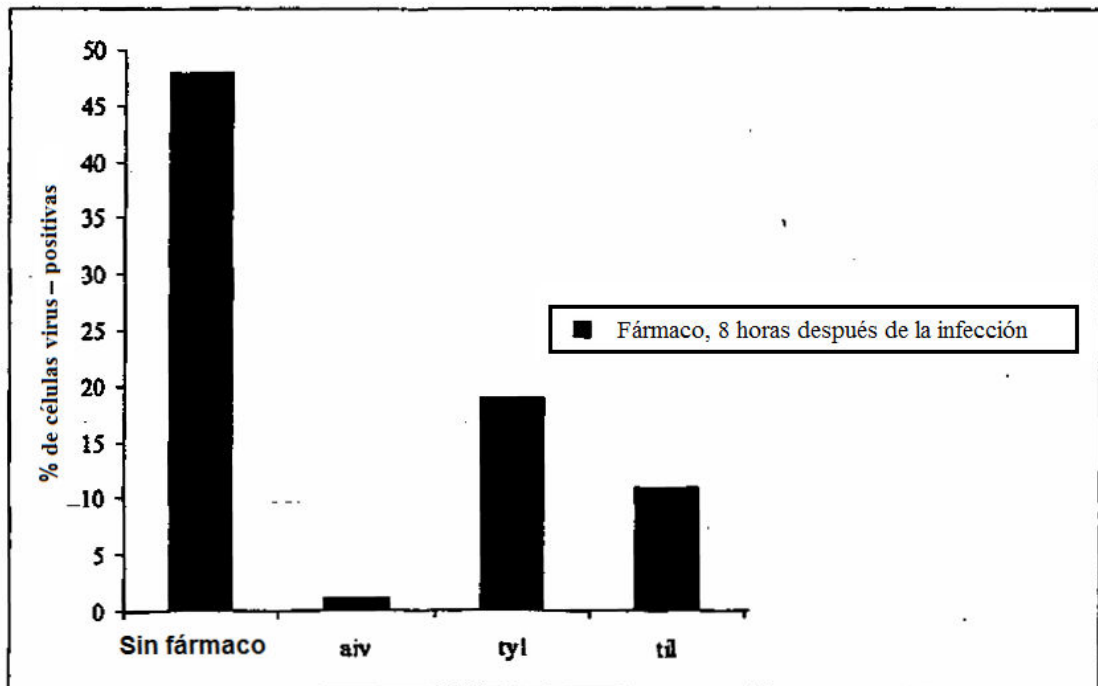


Figura 12

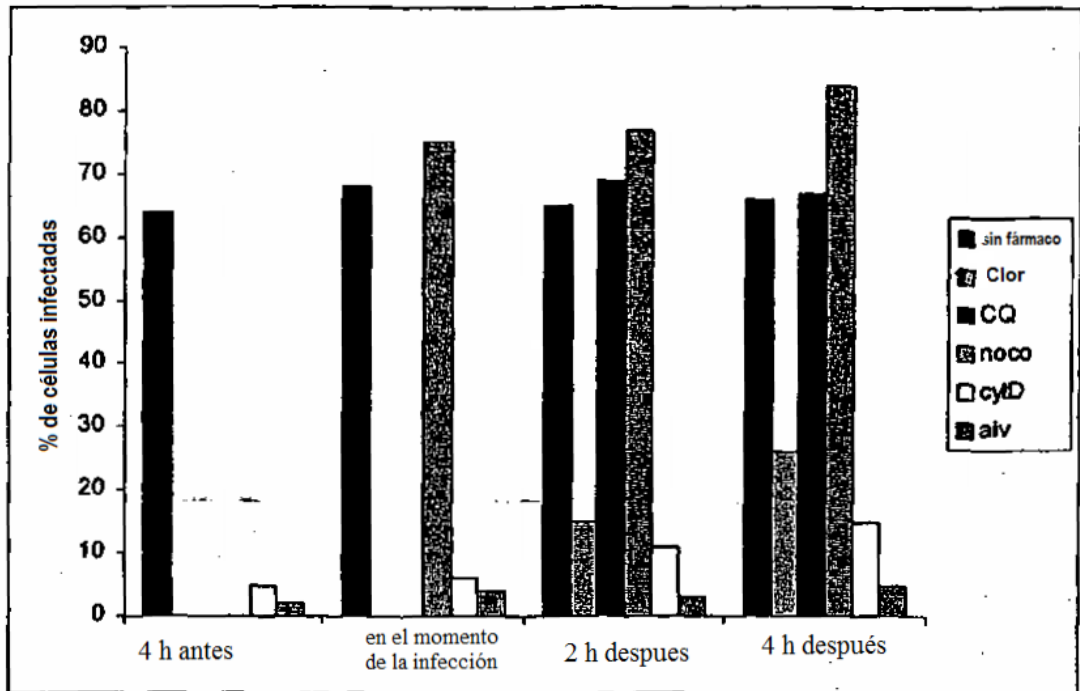


Figura 13

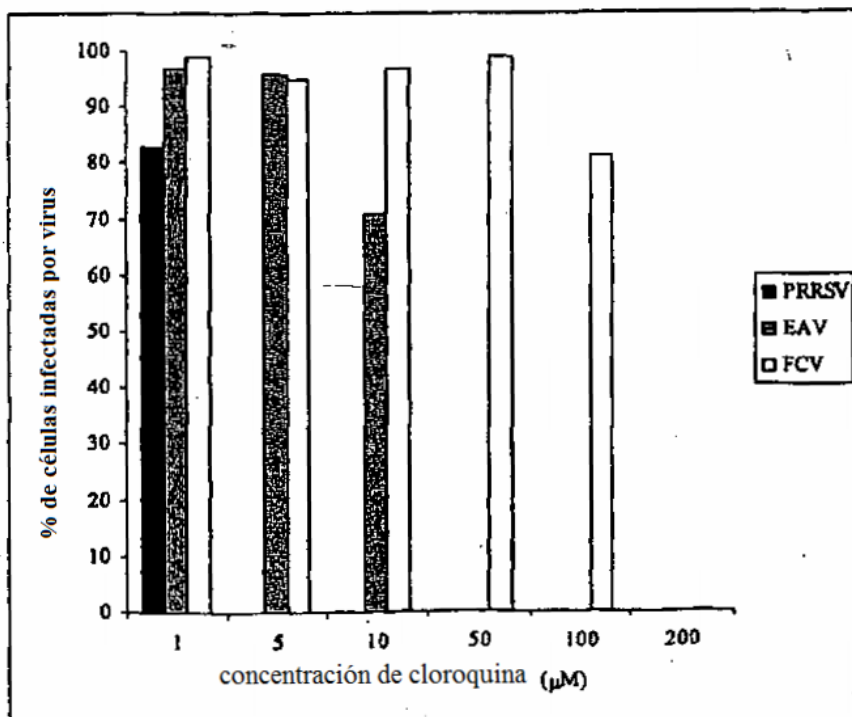


Figura 14

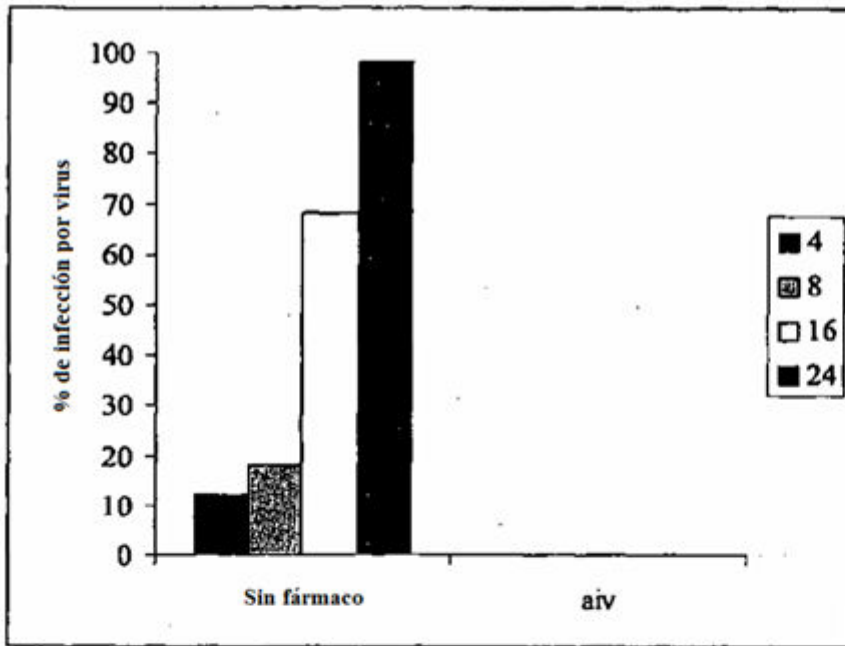


Figura 15a

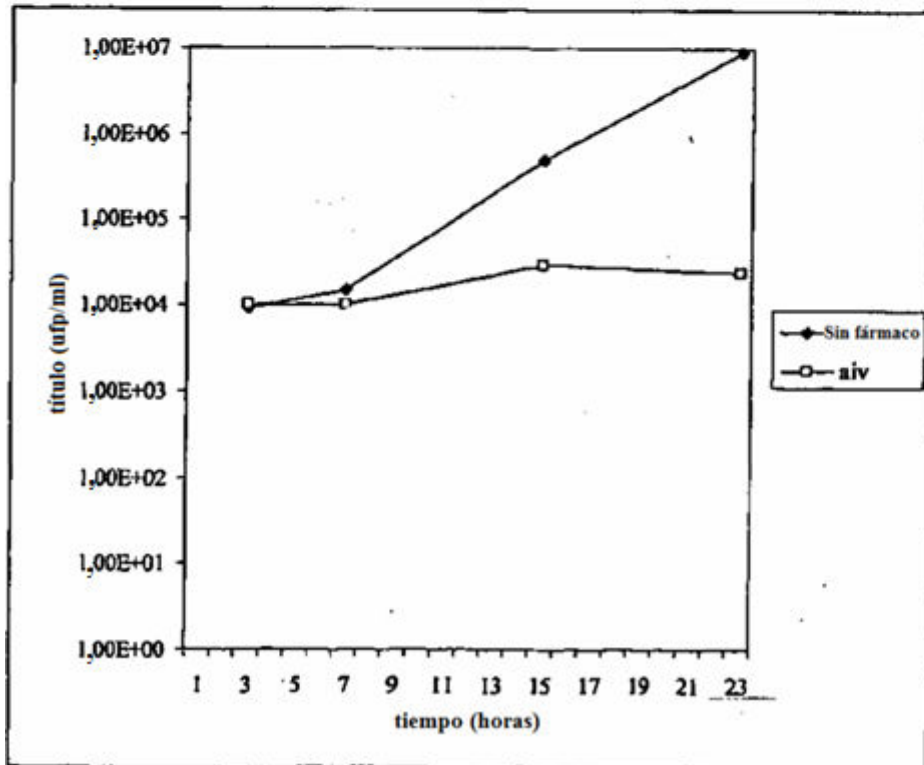


Figura 15b

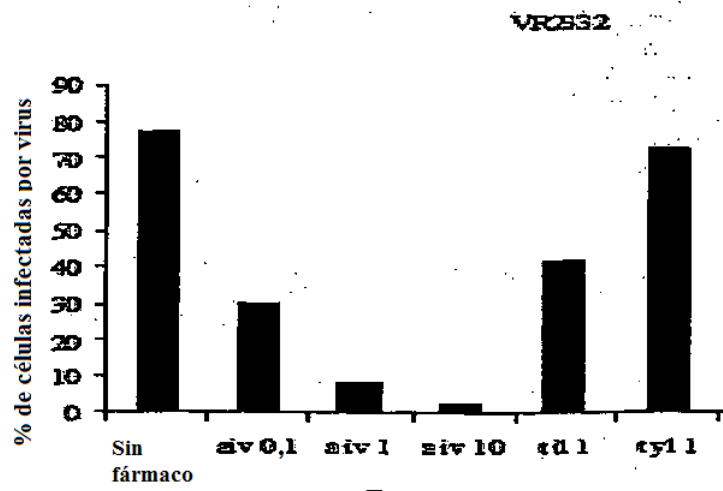


Figura 16

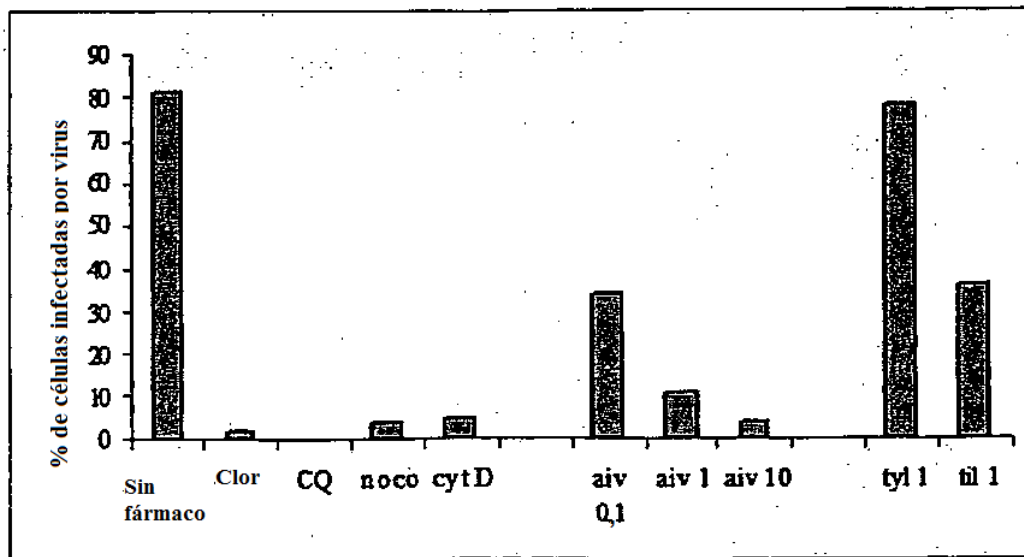


Figura 17

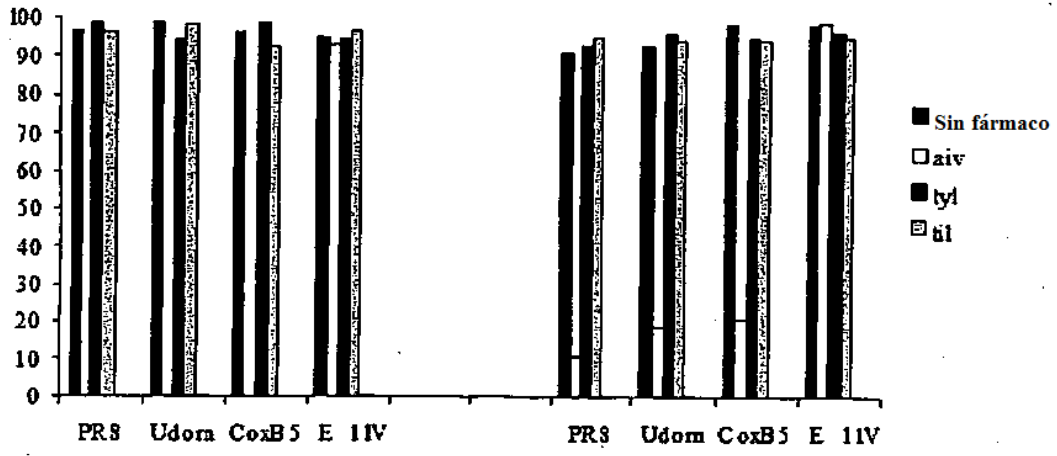


Figura 18

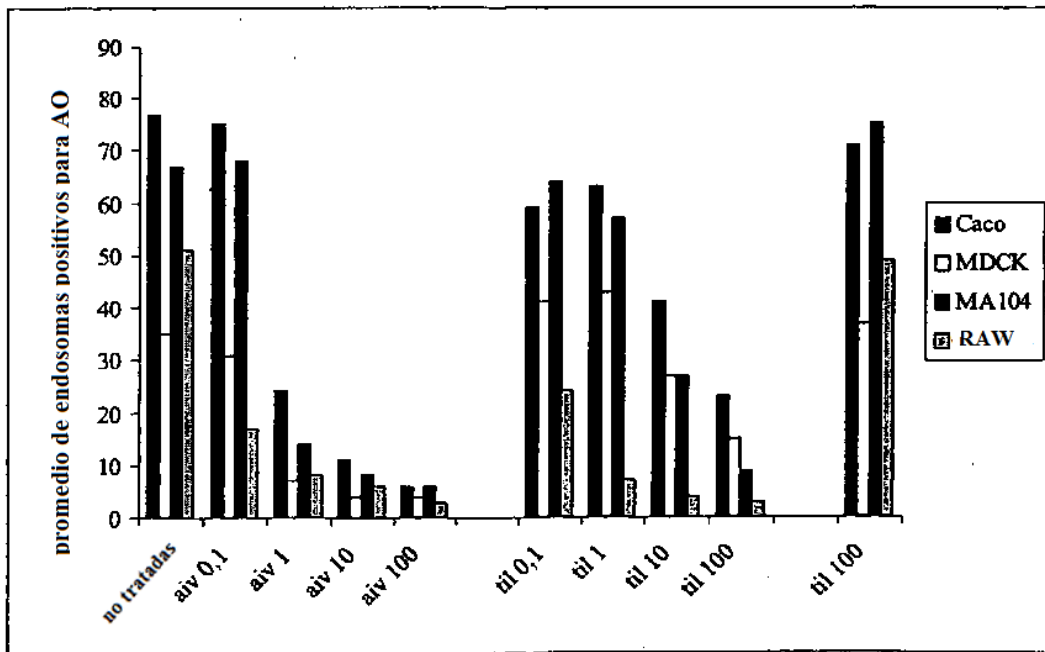


Figura 19