

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 412**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|--------------------|-----------|-------------------|-----------|
| C07K 5/11 | (2006.01) | C12N 9/64 | (2006.01) |
| A61K 31/713 | (2006.01) | C07K 5/09 | (2006.01) |
| A61K 38/07 | (2006.01) | C07K 5/072 | (2006.01) |
| A61K 39/42 | (2006.01) | C07K 5/062 | (2006.01) |
| A61K 9/12 | (2006.01) | C07K 5/093 | (2006.01) |
| A61K 9/72 | (2006.01) | | |
| A61P 31/14 | (2006.01) | | |
| A61P 31/16 | (2006.01) | | |
| A61P 35/00 | (2006.01) | | |
| C07K 5/10 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2012 PCT/CA2012/050349**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12162828**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2012 E 12793674 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2714716**

54 Título: **Inhibidores de matriptasa y usos de los mismos contra infecciones por ortomixovirus**

30 Prioridad:

02.06.2011 US 201161492556 P

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

19.07.2018

73 Titular/es:

**SOCRA SCIENCES SANTÉ ET HUMAINES S.E.C.
(100.0%)
Suite 100 35 rue Radisson
Sherbrooke, Québec J1L 1E2, CA**

72 Inventor/es:

**RICHTER, MARTIN;
LEDUC, RICHARD;
COLOMBO, ÉLOÏC y
MARSAULT, ÉRIC**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 676 412 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

Inhibidores de matriptasa y usos de los mismos contra infecciones por ortomixovirus

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la prevención y/o tratamiento de infecciones por ortomixovirus (por ejemplo, infección por gripe).

10 **Antecedentes de la invención****Gripe - introducción**

15 La gripe es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa causada por el virus de la gripe. Las infecciones respiratorias por gripe, y en particular la gripe A debido a su continua evolución antigénica, tienen el potencial de conducir a pandemias mortales (por ejemplo, 1918, 1957 y 1968). En la historia reciente, sucesos tales como los de Hong Kong en 1997, SARS en 2003, así como la transmisión de la gripe aviar H5N1 directamente a los seres humanos, subrayan el alcance y la gravedad de las consecuencias asociadas a las infecciones de ese tipo. De hecho, de acuerdo con la OMS hay de 3 a 5 millones de casos graves de gripe cada año y de 250 000 a 500 000 muertes por el virus. El virus de la gripe, que pertenece a la familia ortomixovirus, está envuelto y contiene 8 segmentos de ARN monocatenario que codifican de 10 a 12 proteínas. Aunque existen tres tipos de virus de gripe (A, B y C), solo los tipos A y B causan enfermedades significativas en seres humanos, siendo los virus de tipo A los más problemáticos. Los virus de gripe de tipo A son responsables de la mayoría de las epidemias estacionales y se clasifican en subtipos de acuerdo con las glicoproteínas de superficie: hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). El virus de la gripe elude el sistema inmune del hospedador al experimentar una evolución antigénica continua a través de los procesos denominados « deriva » y « desplazamiento » antigénicos. La deriva antigénica es la evolución de cepas virales a través de mutaciones frecuentes entre los sitios de unión de anticuerpo de antígenos de superficie que conducen a la aparición de nuevas variantes no reconocidas adecuadamente por el sistema inmune del hospedador. El desplazamiento antigénico es la razón por la cual, cada temporada, es necesario identificar y predecir las cepas más probables que circularán para producir las vacunas más apropiadas para las vacunas anuales. El desplazamiento antigénico es el resultado de la reasignación del material genético de las cepas en circulación, lo que lleva a la sustitución de las glicoproteínas de superficie HA y, con menor frecuencia, de NA, lo que a su vez conducirá a la aparición de epidemias graves e incluso pandemias (1). Un escenario de este tipo es posible para el virus aviar H5N1 que tiene una tasa de mortalidad de un 50-60 % y el componente H5 del que nunca que ha circulado en la población humana. Dado que los nuevos virus generados a través de un desplazamiento antigénico también experimentan deriva antigénica, esto significa que, en el caso del virus H5N1, esto podría conducir a una transmisión eficaz de ser humano a ser humano y, por lo tanto, a una pandemia.

40 A diferencia de los antígenos de superficie, las proteínas internas del virus no soportan las mismas presiones mutacionales y siguen siendo más conservadas entre cepas. Durante la respuesta inmune celular adaptativa del hospedador, los linfocitos T CD8 eliminan las células epiteliales infectadas a través de un proceso que involucra perforina, granzimas y citoquinas tales como TNF- α e IFN γ . Aunque no proporciona inmunidad esterilizante, como lo hace la respuesta humoral, la respuesta celular reduce de forma significativa los títulos virales de los pulmones. Además, a diferencia de la respuesta humoral que es ineficaz contra virus que portan antígenos de superficie mutados, la respuesta celular reconoce epítomos internos que tienden a estar conservados entre las cepas víricas. Se ha demostrado, tanto experimental como clínicamente, que el virus de la gripe evade fácilmente la respuesta humoral del hospedador a sus antígenos de superficie gracias a sus características mutacionales particulares.

50 En la actualidad están disponibles dos clases de fármacos antigripales: inhibidores del canal M2 viral (por ejemplo, amantadina y rimantadina) e inhibidores de la neuraminidasa viral (por ejemplo, zanamivir y oseltamivir) (2). Los inhibidores del canal M2 viral interactúan directamente con el canal iónico M2 viral que participa en la acidificación y la desencapsulación del virus en los endosomas celulares, y la neuraminidasa viral permite el desprendimiento de viriones nacientes. Se ha demostrado que la dirección a proteínas virales es una estrategia eficaz. Sin embargo, debido a las características mutacionales del virus de la gripe y al uso generalizado de fármacos antivirales, la resistencia se ha convertido en un problema importante (2, 3). Como resultado, ya no se recomiendan inhibidores del canal y único M2 para el tratamiento profiláctico de la gripe. Además, de acuerdo con el Centro para el Control de Enfermedades, casi todas las cepas circulantes en la actualidad de gripe A H3N2 son resistentes a la amantadina y casi todas las cepas H1N1 A circulantes son resistentes al oseltamivir (Tamiflu™). Afortunadamente, la mayoría de las cepas de gripe A H1N1 que surgen a partir de la pandemia de 2009 son susceptibles al fármaco, aunque se han aislado varias cepas resistentes de este virus. Por lo tanto, el direccionamiento a los mecanismos celulares del hospedador que son fundamentales para la entrada, síntesis de proteínas, maduración y replicación del virus de la gripe, proporciona una estrategia alternativa interesante que puede evitar potencialmente el problema de la resistencia.

65 La proteína hemaglutinina (HA) desempeña un papel esencial en la unión y en la entrada en células hospedadoras durante el proceso de infección del virus. La hemaglutinina (HA) se une a los ácidos siálicos monosacáridos que

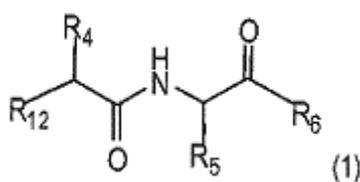
están presentes en la superficie de sus células hospedadoras diana. A continuación la membrana celular envuelve el virus a través de endocitosis y forma endosomas. La afinidad de unión de un tipo de virus de la gripe a los ácidos siálicos en células epiteliales del sistema respiratorio, por lo general en la nariz, faringe, tráquea, bronquios, bronquiolos, alvéolos y pulmones de mamíferos e intestinos de aves, puede afectar a la capacidad del virus para infectar a la especie y a la capacidad de propagarse entre diferentes individuos.

La gripe HA se sintetiza como un único precursor de proteína denominado HA0 y, dado que el virus no codifica ninguna proteasa, se requieren proteasas de la célula hospedadora para la escisión de HA0 en las subunidades HA1 y HA2. Esta escisión es necesaria para que la proteína cambie la conformación en las condiciones ácidas en el endosoma (9, 10). Este cambio en la conformación de la proteína expone al péptido de fusión hidrófobo localizado en la subunidad HA2 (11, 12). Esto permite que el virus se fusione con la célula hospedadora. Las proteínas hemaglutinina de los virus de la gripe aviar patógena se caracterizan por sitios de escisión multibásicos que contienen secuencias de reconocimiento de tipo furina RXXR (13, 14). Dado que algunas proteasas de tipo subtilisina tales como furina u otras proproteínas convertasas están extendidas, la glicoproteína HA de los virus aviares utiliza múltiples tejidos y sitios para su activación y permite la infección y la replicación de estos virus en muchos tipos de células (pantropicidad) (14). Una de las manifestaciones graves del virus de la gripe aviar es una encefalitis potencialmente mortal. Por otro lado, la glicoproteína HA de virus no aviares no tiene el sitio polibásico de reconocimiento de furina. Estos virus tienen sitios de escisión monobásicos reconocidos por otras proteasas (por ejemplo, TTSP) del hospedador (14).

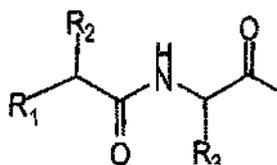
Sumario de la invención

En los estudios que se describen en el presente documento, los inventores han mostrado la proteasa matriptasa transmembrana de tipo II (también conocida como ST14 o TMPRSS14) es capaz de escindir y activar la gripe HA. El ARNm de la matriptasa se identificó en varias células epiteliales del sistema respiratorio humano así como en un extracto de ARN de pulmones humanos sanos. Además, los inventores han demostrado que la proteína matriptasa se expresa en líneas de células epiteliales humanas del sistema respiratorio. La adición de matriptasa a células de Riñón Canino de Mandin-Darby (MDCK), (que no permiten la replicación de la gripe en múltiples ciclos sin una proteasa exógena tal como tripsina), estimula la formación de placas virales, indicando de ese modo que la matriptasa es capaz de activar HA y estimula la replicación de la gripe en múltiples ciclos en estas células. Además, usando tecnología de ARN de interferencia se mostró que la matriptasa que se dirige a los ARNs bloqueando de forma significativa la replicación de la gripe en una línea de células epiteliales humanas que puede estimular la replicación de la gripe sin adición de enzima exógena. Además, los inventores han generado una clase de inhibidores de matriptasa potentes y selectivos que poseen un "elemento de inmovilización de serina" (por ejemplo, un resto de cetobenzotiazol) que bloquea la actividad de matriptasa inhibiendo de ese modo la activación de HA y la replicación de la gripe en células epiteliales de las vías respiratorias humanas.

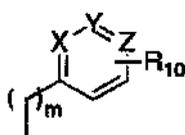
De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto de fórmula (1):



o una sal, hidrato, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R_{12} es NHR_7 ; en el que R_7 es



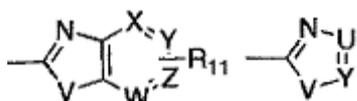
R_1 es H, NH_2 o NHR_7 ; en el que R_7 es un alquilo, arilo, (C=O)-alquilo, (C=O)-arilo, SO_2 -alquilo o SO_2 -arilo;



R_2 y R_5 son independientemente $-CH_2-R_8$ o

en el que R_8 es $(CH_2)_n-NH(C=NH)NH-R_{14}$ en la que,
 n es de 1 a 4;
 m es de 0 a 3;
 R_{10} es $-C(=NH)-NH_2$, NH_2 o NH alquilo; y
 R_{14} es H;

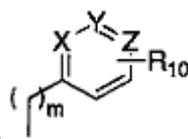
R_3 es un alquilo lineal; un alquilo sustituido con $(CO)NH_2$, $(CO)OH$, NH_2 , $NHCO$ -alquilo, $NHCO$ -arilo, $NHSO_2$ -alquilo, $NHSO_2$ -arilo o heteroarilo; o un arilo o un arilo sustituido;
 y R_4 es un alquilo, un arilo, a alquilo sustituido, o un arilo sustituido;



R_6 es CF_3 , CO_2H , $CONH$ -alquilo, $CONH$ -arilo o $CONH$ -aminoácido;
 en los que W , X , Y y Z son independientemente N o CH ; V y U son independientemente O , NH , NCH_3 o S ;
 R_{11} es H , CO_2H , $CONH$ -alquilo, $CONH$ -arilo, arilo, heteroarilo.

En una realización específica,

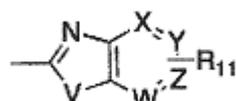
(i) R_1 es $-H$ o $-NH_2$;



(ii) R_2 es CF_3 , CO_2H , $CONH$ -alquilo, $CONH$ -arilo o $CONH$ -aminoácido;
 (iii) m es 1;
 (iv) W es CH ;
 (v) X es CH ;
 (vi) Y es CH ;
 (vii) R_{10} es $-C(=NH)NH_2$; o
 (viii) cualquier combinación de (i) a (vii).

En otra realización específica,

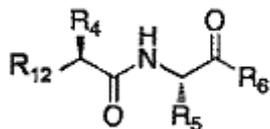
(i) R_1 es $-NH_2$;
 (ii) R_2 es $-CH_2-R_8$;
 (iii) R_3 es un alquilo sustituido;
 (iv) R_4 es un alquilo;
 (v) R_5 es $-CH_2-R_8$;



(v) R_6 es CF_3 , CO_2H , $CONH$ -alquilo, $CONH$ -arilo o $CONH$ -aminoácido;
 (vi) R_8 es $-(CH_2)_3NH(C=NH)NH_2$;
 (vii) W es CH ;
 (viii) X es CH ;
 (ix) Y es CH ;
 (x) Z es CH ;
 (xi) V es S ;
 (xii) R_{11} es H ; o
 (xiii) cualquier combinación de (i) a (xii).

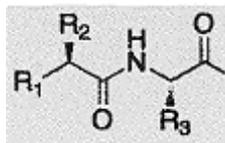
R_3 es un alquilo sustituido, que está sustituido con $(CO)NH_2$, $(CO)OH$, NH_2 , $NHCO$ -alquilo, $NHCO$ -arilo, $NHSO_2$ -alquilo, $NHSO_2$ -arilo o heteroarilo. En otra realización específica, R_3 es un alquilo de C_1 a C_6 sustituido. En otra realización específica, R_3 es un alquilo de C_1 a C_3 sustituido. En otra realización específica, R_3 es $-(CH_2)_2C(=O)NH_2$. En otra realización específica, R_4 es un alquilo de C_1 a C_6 . En otra realización específica, R_4 es un alquilo de C_1 a C_3 . En otra realización específica, R_4 es $-CH_3$. En otra realización específica, R_2 y R_5 quien en la configuración (S).

En otra realización específica, el compuesto tiene la fórmula (1.1):



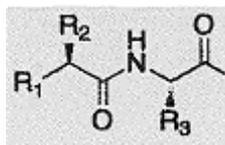
en la que
R₁₂ es NHR₇, en el que R₇ es

5



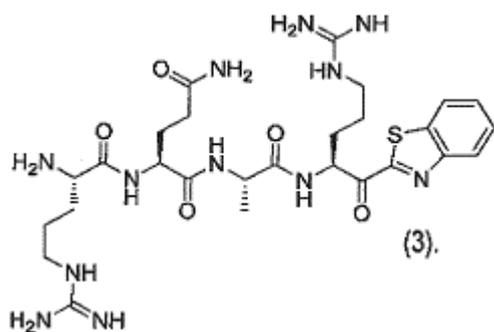
y

10 en el que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₈, R₁₀, R₁₁ y R₁₃ son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones.



En otra realización específica, el compuesto tiene la fórmula (3):

15



De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende el compuesto de la presente invención, y

20

- (a) un agente terapéutico adicional para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus y/o síntomas asociados;
- (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable; o
- (c) una combinación de (a) y (b).

25

En una realización específica, dicha infección por ortomixovirus es una infección por gripe.

En otra realización específica, dicho agente terapéutico adicional es un inhibidor del canal iónico M2 viral o un inhibidor de neuraminidasa.

30

En otra realización específica, dicho agente terapéutico adicional es Tamiflu™ (oseltamivir), Relenza™ (zanamivir), laninamivir, peramivir, amantadina, rimantadina, ribavirina, vitamina C, Cold Fx™, equinácea, ginseng o cualquier combinación de los mismos.

35

En otra realización específica, la composición se formula para administración directa en los pulmones.

En otra realización específica, la composición es para su administración con un inhalador o nebulizador.

40

De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para inhibir la actividad de matriptasa en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de: (i) un compuesto como se

define en el presente documento; o (ii) una composición como se define en el presente documento; a través del cual dicha actividad de matriptasa se inhibe. En una realización específica, dicha célula es una célula epitelial del sistema respiratorio.

5 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de un inhibidor de matriptasa, o una composición que comprende dicho inhibidor, para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus en un sujeto.

10 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona un inhibidor de matriptasa, o una composición que comprende dicho inhibidor, para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus en un sujeto.

Dicho inhibidor de matriptasa es un compuesto como se define en el presente documento. Dicha composición es una composición como se define en el presente documento.

15 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de (i) un compuesto como se define en el presente documento; o (ii) una composición como se define en el presente documento, para inhibir la actividad de matriptasa en una célula.

20 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de (i) un compuesto como se define en el presente documento; o (ii) una composición como se define en el presente documento, para la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de matriptasa en una célula. En una realización específica, dicha célula es una célula epitelial del sistema respiratorio.

25 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un inhibidor de matriptasa, o una composición que comprende dicho inhibidor, para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus en una célula.

30 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un inhibidor de matriptasa, o una composición que comprende dicho inhibidor, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus en una célula. En una realización específica, dicho inhibidor de matriptasa es un compuesto como se define en el presente documento. En otra realización específica, dicha composición o medicamento es una composición como se define en el presente documento. En otra realización específica, dicho inhibidor de matriptasa es uno o más de los compuestos que se representan en las Tablas 2 a 6. En otra realización específica, dicho inhibidor de matriptasa es un anticuerpo que reconoce de forma específica el dominio catalítico de matriptasa. En otra realización específica, dicho anticuerpo que reconocer de forma específica al dominio catalítico de matriptasa comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera y/o pesada que se define en la Tabla 1. En otra realización específica, dicho anticuerpo que reconoce de forma específica al dominio catalítico de matriptasa comprende la secuencia de la cadena ligera y/o es a la que se define en la Tabla 1. En otra realización específica, dicho inhibidor de matriptasa es un agente de ARN de interferencia que disminuye la expresión de matriptasa. En otra realización específica, dicho agente de ARN interferencia es un ARNsi. En otra realización específica, la infección por ortomixovirus es una infección por gripe. En otra realización específica, la infección por gripe es una infección por gripe de tipo A.

45 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto como se define en el presente documento, o la composición como se define en el presente documento, para inhibir la actividad de matriptasa en una célula.

50 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto como se define en el presente documento, o una composición como se define en el presente documento, para la preparación de un medicamento para inhibir la actividad de matriptasa en una célula. En una realización específica, dicha célula es una célula epitelial del sistema respiratorio.

55 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit que con de un inhibidor de matriptasa, o una composición que comprende dicho inhibidor, e instrucciones para el uso del mismo para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus en un sujeto. Dicho inhibidor o composición de matriptasa es un compuesto o composición como se define en el presente documento. En otra realización específica, la infección por ortomixovirus es una infección por gripe. En otra realización específica, la infección por gripe es una infección por gripe de tipo A.

60 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto como se define en el presente documento, o una composición como se define en el presente documento, para la inhibición del crecimiento, progresión y/o metástasis tumoral en un sujeto.

65 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto como se define en el presente documento, o una composición como se define en el presente documento, para la inhibición del crecimiento, progresión y/o metástasis tumoral en un sujeto.

De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto como se define en el presente documento, o una composición como se define en el presente documento, para la preparación de un medicamento para la inhibición del crecimiento, progresión y/o metástasis tumoral en un sujeto.

5 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el compuesto de la presente invención, y (a) un agente terapéutico adicional para el tratamiento o la prevención de infecciones por gripe y/o síntomas asociados; (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable; o (c) una combinación de (a) y (b).

10 En una realización específica, dicho agente terapéutico adicional es un inhibidor del canal iónico M2 viral o un inhibidor de neuraminidasa. En otra realización específica de la composición de la presente invención, dicho agente terapéutico adicional es Tamiflu™ (oseltamivir), Relenza™ (zanamivir), laninamivir, peramivir, amantadina, rimantadina, ribavirina, vitamina C, Cold Fx™, equinácea, ginseng o cualquier combinación de los mismos.

15 En otra realización específica, la composición se formula para administración directa en los pulmones. En otra realización específica de la composición de la presente invención, la composición se formula para su administración con un inhalador o nebulizador.

20 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de: (i) el compuesto de la presente invención; (ii) la composición de la presente invención; o (iii) una molécula de ARN de interferencia corto (ARNsi) que disminuye la expresión de matriptasa, para (a) el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus; o (b) para la inhibición de la actividad de matriptasa en una célula.

25 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un uso de: (i) el compuesto de la presente invención; (ii) la composición de la presente invención; o (iii) una molécula de ARN de interferencia corto (ARNsi) que disminuye la expresión de matriptasa, en la preparación de un medicamento para (a) el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus; o (b) para la inhibición de la actividad de matriptasa en una célula.

30 En una realización específica, la infección por ortomixovirus es una infección por gripe. En otra realización específica del uso de la presente invención, la infección por gripe es una infección por gripe de tipo A.

En otra realización específica, dicha célula es una célula epitelial del sistema respiratorio.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto de la presente invención o una composición de la presente invención, para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus.

40 En una realización específica del compuesto o composición de la presente invención, la infección por ortomixovirus es una infección por gripe. En otra realización específica del compuesto o composición de la presente invención, la infección por gripe es una infección por gripe de tipo A. En otra realización específica del compuesto o composición de la presente invención, dicha célula es una célula epitelial del sistema respiratorio.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un kit que comprende: (i) el compuesto de la presente invención o (ii) la composición de la presente invención, e instrucciones para el uso del mismo para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus.

50 En una realización específica del kit de la presente invención, la infección por ortomixovirus es una infección por gripe. En otra realización específica del kit de la presente invención, la infección por gripe es una infección por gripe de tipo A. En otra realización específica del kit de la presente invención, dicha célula es una célula epitelial del sistema respiratorio.

55 En una realización específica del método, el uso, el compuesto para uso, composición para uso, o kit de la presente invención, la infección por gripe está causada por un virus de tipo A. En una realización específica del método, el uso, el compuesto para uso, composición para uso, o kit de la presente invención, la infección por gripe está causada por un virus de tipo B. En una realización específica del método, el uso, el compuesto para uso, composición para uso, o kit de la presente invención, la infección por gripe está causada por un virus de tipo C.

60 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que tiene la fórmula (1), (1.1) o (1.2) para la prevención o tratamiento de infección por gripe. En una realización, la composición comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición inhibe la activación de la hemaglutinina. En una realización, la composición inhibe la replicación y la propagación virales sostenidas. En una realización la composición reduce la carga/título viral en la sangre, células de un sujeto infectado, células o en un frotis nasofaríngeo de ese sujeto. En una realización, las células son células epiteliales del sistema respiratorio (por ejemplo, célula nasal, de la faringe, traqueal, bronquial, bronquiolar, alveolar y del epitelio pulmonar).

65 Por consiguiente, la composición de la presente invención puede comprender productos adicionales para la prevención o el tratamiento de cualquier síntoma de una infección por ortomixovirus (por ejemplo, gripe) (por

ejemplo, antitusivo, expectorante, antiinflamatorio analgésico, descongestivo) o se puede usar en combinación con cualquier medicina para la gripe adicional. Los ejemplos no limitantes de medicina para la gripe adicional incluyen inhibidores del canal iónico M2 viral e inhibidores de neuraminidasa. Los agentes terapéuticos conocidos para la prevención y el tratamiento de infecciones por gripe incluye Tamiflu™ (oseltamivir), Relenza™ (zanamivir), laninamivir, peramivir, amantadina, rimantadina, ribavirina, vitamina C, Cold Fx™, equinácea, ginseng, etc. En otra realización particular, la composición de la presente invención comprende un único ingrediente medicinal para la prevención o tratamiento de infección por gripe, una composición que comprende el compuesto de fórmula (1), (1.1), (1.2), (2.1) o (3).

La presente divulgación también proporciona un método para inhibir la actividad de matriptasa en una célula que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de (i) un compuesto de la presente invención; (ii) una composición que comprende un compuesto de la presente invención o (iii) una molécula de ARN de interferencia corto (ARNsi) que disminuye la expresión de matriptasa, de modo que la actividad de matriptasa se inhibe. En una realización, el inhibidor es el de fórmula (1). En otra realización, el inhibidor es el de fórmula (1.1). En otra realización, el inhibidor es el de fórmula (1.2). En otra realización, el inhibidor es el de fórmula (2.1). En otra realización, el inhibidor es el de fórmula (3).

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para inhibir la infección por gripe en una célula que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de (i) un compuesto de la presente invención; (ii) una composición que comprende un compuesto de la presente invención; o (iii) una molécula de ARN de interferencia corto (ARNsi) que disminuye la expresión de matriptasa, de modo que la infección por gripe se inhibe. En una realización, el inhibidor es el de fórmula (1). En otra realización, el inhibidor es el de fórmula (1.1). En otra realización, el inhibidor es el de fórmula (1.2). En otra realización, el inhibidor es el de fórmula (2.1). En otra realización, el inhibidor es el de fórmula (3).

La presente invención también se refiere a (i) un compuesto de la presente invención o (ii) una composición que comprende un compuesto de la presente invención, para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus.

La presente divulgación también se refiere al uso de (i) un compuesto de la presente invención; (ii) una composición que comprende un compuesto de la presente invención; o (iii) una molécula de ARN de interferencia corto (ARNsi) que disminuye la expresión de matriptasa para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de infecciones por gripe.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso del compuesto o composiciones de la presente invención para ensayos de investigación (por ejemplo, ensayos bioquímicos, enzimáticos, modelos *in vitro* o *in vivo*).

Las composiciones que comprenden un inhibidor o ARNi o anticuerpo se pueden formular diversas maneras de acuerdo con la vía de administración, las composiciones por los ARNi se pueden administrar de cualquier manera adecuada incluyendo por ejemplo por vía oral, por vía nasal o por vía tópica. La administración se realiza de una manera habitual, preferentemente de forma directa al pulmón del sujeto (por ejemplo, a través de nebulizador o un inhalador).

Breve descripción de las figuras

En las figuras adjuntas:

Las Figuras 1A y 1B muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1); y la secuencia de proteínas (SEQ ID NO: 2), respectivamente de la matriptasa.

La Figura 2 muestra la expresión de ARNm de matriptasa en líneas de células epiteliales del sistema respiratorio humano (Calu-3, H292, A549, Beas-2B) y en un extracto de ARN de pulmón humano normal (Pulmón; Ambion).

La Figura 3 muestra análisis de transferencia de Western de expresión de proteína matriptasa en líneas de células epiteliales del sistema respiratorio humano (panel superior: A549, Calu-3, Beas-2 y H292; panel inferior: Calu-3, H292, NHBE y 16-HBE). Los extractos de proteína de célula completa se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Usando un anticuerpo anti-humano/ratón de conejo y anticuerpo secundario anti-conejo-HRP específicos de matriptasa, se desvelaron bandas usando el reactivo ECL. En el panel inferior, los extractos de células Calu-3, NCI-H292 y NHBE se analizaron en el mismo gel y los extractos de células 16-HBE se analizaron en un gel separado usando pocillos más pequeños. Los resultados presentados se reconstituyen a partir de los dos geles.

La Figura 4 muestra que la proteína matriptasa se expresa mediante células epiteliales de las vías respiratorias (células Calu-3) y que se localiza al menos en las membranas plasmáticas de estas células. Panel superior: Inmunofluorescencia de matriptasa en células Calu-3. Las células Calu-3 se dejaron crecer en cubreobjetos y se tiñeron con DAPI (tinción del núcleo), Dil (tinción de membranas) y anticuerpo de matriptasa anti-humano de conejo

Alexa-488. La fluorescencia se detectó usando microscopía de epifluorescencia y filtros apropiados. Panel inferior: las células Calu-3 se dejaron crecer en cámaras de transpocillo hasta confluencia (uniones estrechas; resistencia eléctrica elevada). Las membranas transpocillo se retiraron y se colocaron en bloques de parafina. Se cortaron secciones de cinco micrómetros y se tiñeron con DAPI (tinción del núcleo) y anticuerpo de matriptasa anti-humano de conejo y anti-conejo Alexa-647. La fluorescencia se detectó usando microscopía confocal. La línea recta bajo las células representa tinción específica de la membrana transpocillo en el que crecieron las células.

La Figura 5 muestra la escisión de octapéptidos fluorescentes interrumpidos de forma interna de secuencia de HA por Matriptasa. Se diseñaron sustratos peptídicos fluorescentes (IQFP) de ácido orto-Aminobenzoico (Abz) interrumpidos de forma interna basándose en secuencias consenso de las HA de gripe más relevantes para seres humanos (H1 y H3) con la estructura general Abz-XXXR↓GLFG-Tyr(3-NO₂) (SEQ ID NO: 6). La secuencia de H1 era Abz-IQSR↓GLFG-Tyr(3-NO₂) (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de H3 era Abz-KQTR↓GLFG-Tyr(3-NO₂) (SEQ ID NO: 8). La flecha que apunta hacia abajo representa el sitio de escisión entre el sitio de reconocimiento enzimático (P4-P1) y los primeros cuatro aminoácidos del péptido de fusión de gripe (P1'-P4'; conservados entre todas las cepas de gripe). Los IQFP que contenían secuencias de H1 o H3 de HA a concentración fija se incubaron con matriptasa recombinante tal como se ha descrito anteriormente (Beliveau, F., A. Desilets, y R. Leduc. 2009. Probing the substrate specificities of matriptase, matriptase-2, hepsin and DESC1 with internally quenched fluorescent peptides. *Febs J* **276**: 2213-2226). Estos datos indican que la Matriptasa tiene el potencial de escindir secuencias de H1 y H3.

La Figura 6 muestra análisis de transferencia de Western de escisión de HA de gripe con matriptasa. Se generaron virus HA0 del virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (PR8) (virus con HA sin escindir) como se describe en Klenk *et al.* 1984. Los virus HA0 se incubaron con matriptasa 500 nM (o tripsina 200 nM como control positivo) durante 2 h a 37 °C y las partículas virales se interrumpieron usando triton X-100 a una concentración final de un 1 %. Los extractos proteicos virales se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Usando un anticuerpo de proteína anti-viral de conejo específico de H1 (H1N1/Pan) y anticuerpo secundario anti-conejo-HRP, Se desvelaron bandas usando el reactivo ECL. HA0 indica HA sin escindir y HA1 representa el fragmento de HA1 de la HA escindida.

La Figura 7 muestra que la matriptasa estimula la replicación de la gripe en múltiples ciclos en células MDCK infectadas con 25 UFP de virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (PR8). Panel A: Se añadió matriptasa recombinante (43 nM) a células MDCK y las células infectaron con 25 UFP de virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (PR8). Se observaron placas virales en presencia de matriptasa (o tripsina, la proteasa patrón usada en este ensayo) indicando de ese modo activación viral por la enzima. En comparación con la tripsina, la matriptasa era aprox. un 80 % tan eficaz en el inicio de placas virales. Panel B: Recopilación de resultados y eficacia de IN-1 (Compuesto 1), una matriptasa de inhibición en este ensayo (sin efecto en la tripsina lo que indica selectividad). Panel C: Curva de concentración-respuesta de inhibición de formación de placas de PR8 en presencia de IN-1 en células MDCK cells suplementadas con Matriptasa (43 nM). Las placas virales se observan en presencia de matriptasa (o tripsina) indicando de ese modo activación viral por la enzima.

La Figura 8 muestra que los ARNsi que se dirigen ARNm de matriptasa bloquean de forma significativa la expresión de la proteína matriptasa. Las células Calu-3 se transfirieron con dos ARNsi diferentes (50 nmol) dirigidos hacia el ARNm de matriptasa usando diversas concentraciones de Lipofectamina RNAiMAX™ (de 0,5 a 1,5 µl). Los ARNsi codificados se usaron como controles. Panel A: Transferencia de Western de extractos de proteína total de células Calu-3. La matriptasa se identificó usando un anticuerpo de conejo anti-humano ST14 (matriptasa). S: control de ARNsi codificado transfectado; 1: ARNsi 1 transfectado dirigido a matriptasa; 2: ARNsi 2 transfectado dirigido a matriptasa; Células sin transfectar de ctrl. Análisis de densitometría de ARNsi de atenuación genética de expresión de proteína matriptasa en células Calu-3. Panel B: El análisis de densitometría de aplicaciones puntuales realizadas en (A) desveló que los ARNsi dirigidos por matriptasa inhibían de forma significativa la expresión de la proteína matriptasa en células Calu-3 48 h después de transfección.

La Figura 9 muestra que la matriptasa estimula la activación de la HA de la gripe y la replicación viral en células epiteliales de las vías respiratorias. Las células Calu-3 cells se transfectaron (1,5 µl de Lipofectamina RNAiMAX™) con los ARNsi dirigidos a matriptasa 48 h antes de la infección (los ARNsi codificados se usaron como controles). Después de la transfección, las células se lavaron y se infectaron con gripe A/Puerto Rico/8/34 (1000 UFP) durante 1 h para permitir la unión viral. A continuación las células se lavaron y se incubaron durante 48 h. Los sobrenadantes se recogieron y se sometieron al ensayo para partículas virales infecciosas usando el sistema de MDCK/tripsina.

La Figura 10 muestra que un tetrapéptido de cetobenzotiazol representativo de los compuestos de la invención inhibe la matriptasa. La matriptasa humana purificada recombinante (aminoácidos 596-855) (1 nM) se incubó con vehículo (DMSO al 1 %) o 1 µM de inhibidores (IN-1 y IN-2) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La actividad proteolítica se monitorizó usando Boc-Gln-Ala-Arg-AMC como un péptido fluorogénico (50 µM). Los resultados se presentan como actividad relativa en comparación con la reacción de control (vehículo = 1).

Las Figuras 11A y 11B muestran la disociación del complejo de enzima:inhibidor (EI) usando experimentos de dilución. La Figura 11A informa de las curvas de disociación para el inhibidor de cetobenzotiazol IN-1 y la Figura 11B

informa de las curvas de disociación para el inhibidor irreversible Glu-Gly-Arg clorometil cetona (EGR-CMK). La matriptasa y concentraciones crecientes de (A) RQAR-cetobenzotiazol (IN-1, compuesto **1** en la Tabla 7) o (B) EGR-CMK se incubaron previamente durante 20 minutos a temperatura ambiente y se diluyeron 2000 veces en un tampón de reacción que contenía Boc-QAR-AMC 400 μ M. La concentración final de matriptasa era 0,25 nM y se varió tal como se indica para inhibidores. La actividad proteolítica en el tampón de reacción se midió como se describe a continuación.

La Figura 12 muestra que el inhibidor de cetobenzotiazol IN-1, inhibe la matriptasa en *cellulo*. Los resultados muestran la actividad enzimática medida (unidades de fluorescencia por minuto por ml de medio) en cada condición.

Las Figuras 13A, 13B y 13C muestran la selectividad de IN-1 hacia la matriptasa. La Figura 13A muestra la inhibición de la actividad enzimática de diversas proteasas (1 nM) con el compuesto IN-1 (1 μ M). Los datos se presentan como actividad relativa en comparación con la reacción de control (vehículo = 1) (columnas de color blanco). Las Figuras 13B y 13C muestran la determinación de la CI_{50} de IN-1 para matriptasa (B) y hepsina (C), respectivamente. Las actividades relativas (Vi/Vo) se representaron como una función de la transformación log de la concentración de inhibidor (log I). Los datos se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal usando el software GraphPad™ Prism 5. La CI_{50} corresponde a la concentración de inhibidor que da como resultado una respuesta a medio camino entre la respuesta máxima y la respuesta inhibitoria máxima.

La Figura 14 muestra que el compuesto IN-1 anula completamente la replicación de la gripe en células MDCK con matriptasa como la serina proteasa activante. Las células MDCK se cultivaron hasta confluencia y se infectaron con 25 UFP de virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 durante 1 h (PR8) para permitir la unión viral, en medio incompleto que contenía BSA. A continuación las células se lavaron y se añadió un 1,8 % de solución de celulosa microcristalina Avicel en MEM que contenía 43 nM de matriptasa para permitir la formación de placas viales. El inhibidor de matriptasa IN-1 se añadió al ensayo 1 h después de la unión viral.

La Figura 15 es una representación gráfica de una recopilación de resultados que se presentan en las Figuras 7 y 14, y experimentos adicionales usando tripsina como la proteasa activante. Se hizo el recuento de las placas virales en cada replicado y los resultados se compararon.

La Figura 16 muestra que el compuesto IN-1 bloquea la replicación de la gripe en células epiteliales de las vías respiratorias. Panel superior: las células Calu-3 se cultivaron hasta confluencia, se lavaron y se infectaron con gripe A/Puerto Rico/8/34 (1000 UFP) durante 1 h para permitir la unión viral. A continuación las células se lavaron y se incubaron durante 72 h en presencia o ausencia de IN-1 1 μ M (o DMSO como el control de vehículo a una concentración final de 1:1000). Los sobrenadantes se recogieron y se sometieron al ensayo para partículas virales infecciosas usando el sistema de ensayo de placas virales de MDCK/tripsina. Panel inferior: Curva de concentración inhibitoria-respuesta de IN-1 en células Calu-3 infectadas con gripe PR8 (H1N1). El procedimiento es idéntico al que se ha descrito anteriormente excepto porque se añadió IN-1 a concentraciones crecientes. Los datos se representaron usando el software GraphPad™ Prism y la CI_{50} se determinó.

La Figura 17 muestra la curva de concentración inhibitoria-respuesta de IN-1 en células Calu-3 infectadas con virus de la gripe influenza A/Hong Kong/X-31 o una cepa del virus H1N1 pandémico de 2009 aislado en Quebec durante la pandemia (A/similar a California /04/09). Las células Calu-3 se hicieron crecer hasta confluencia y se infectaron con 1000 UFP de virus de la gripe durante 1 h. Las células se lavaron y se añadió IN-1 a concentraciones crecientes. Los sobrenadantes celulares que contenían virus recién formados se cosecharon y se valoraron usando células MDCK. Los datos se representaron usando el software GraphPad™ Prism.

La Figura 18 muestra un modelado molecular del acoplamiento de IN-1 en el sitio activo de matriptasa. La imagen se generó usando Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Versión 1.2r1pre, Schrödinger, LLC, 26). Los números se refieren a la numeración de la matriptasa.

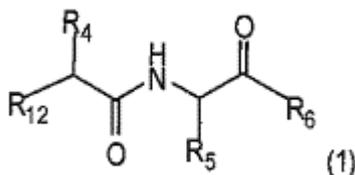
Descripción de realizaciones ilustrativas

Los resultados que se presentan en el presente documento muestran por primera vez que la matriptasa, una serina proteasa transmembrana de tipo II, se expresa en células epiteliales del sistema respiratorio a los niveles tanto ARNm como proteico. Además, los inventores han descubierto que la matriptasa es capaz de estimular la replicación de la gripe en múltiples ciclos tanto en un sistema en el que se requiere una proteasa exógena para activación de hemaglutinina de gripe como en un sistema en el que las células poseen todas las enzimas necesarias para activar el virus de la gripe. Además, los resultados confirmaron que la matriptasa está implicada en la replicación de la gripe en células aéreas de las vías respiratorias a través de ensayos de inhibición usando nuevos inhibidores así como en un sistema de atenuación genética de ARNs que se dirige a matriptasa. Por último, los resultados que se presentan en el presente documento muestran que los inhibidores de matriptasa son eficaces para el bloqueo de la replicación de la gripe *in vitro* y que éstos muestran selectividad hacia matriptasa.

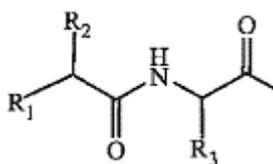
Los inhibidores de matriptasa que se describen se dirigen a la célula hospedadora (una proteína hospedadora) y no al virus directamente. Se hace la hipótesis de que esto puede reducir la adaptación viral porque las proteínas virales

no se dirigen directamente, evitando de ese modo mutaciones virales continuas. En segundo lugar, dado que los tipos de gripe tanto A como B necesitan escisión proteolítica de hemaglutinina para su activación, se hace la hipótesis de que los inhibidores de matriptasa que se describen en el presente documento tienen un amplio espectro de actividad. Dado que los agentes antivirales antigripales (bloqueadores de canales iónicos M2 e inhibidores de neuraminidasa) presentan cada vez más resistencia, la inhibición de la matriptasa se puede usar como terapia de primera línea. La inhibición de la matriptasa también se puede usar en combinación con otros agentes antivirales (por ejemplo, bloqueadores de canales iónicos M2 e inhibidores de neuraminidasa) en intentos para minimizar la generación de mutantes de escape que conducen a resistencia antiviral.

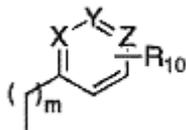
10 La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (1):



15 o una sal, hidrato, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R₁₂ es NHR₇; en la que R₇ es



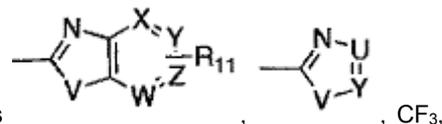
20 R₁ es H, NH₂ o NHR₇; en el que R₇ es un alquilo, arilo, (C=O)-alquilo, (C=O)-arilo, SO₂-alquilo o SO₂-arilo;



R₂ y R₅ son independientemente -CH₂-R₈ o

25 en el que R₈ es (CH₂)_n-NH(C=NH)NH-R₁₄, en el que n es de 1 a 3 (1, 2 o 3); m es de 0 a 3 (0, 1, 2 o 3); y R₁₀ es -C(=NH)-NH₂, NH₂ o NH alquilo; y R₁₄ es H;

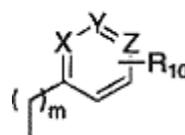
R₃ es un alquilo lineal; un alquilo sustituido con (CO)NH₂, (CO)OH, NH₂, NHCO-alquilo, NHCO-arilo, NHSO₂-alquilo, NHSO₂-arilo o heteroarilo; o un arilo o un arilo sustituido; y R₄ es un alquilo, un arilo, un alquilo sustituido o un arilo sustituido,



30 R₆ es un elemento de inmovilización de serina, en una realización R₆ es CO₂H, CONH-alquilo, CONH-arilo o CONH-aminoácido;

en los que W, X, Y y Z son independientemente N o CH; V y U son independientemente O, NH, NCH₃ o S;

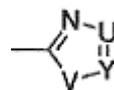
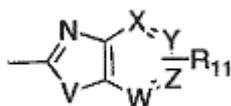
35 R₁₁ es H, CO₂H, CONH-alquilo, CONH-arilo, arilo, heteroarilo.



En una realización, R₂ y/o R₅ es-CH₂-R₈. En otra realización, R₂ y/o R₅ es

40 En una realización, R₁₀ es -C(=NH)-NH₂. En otra realización, R₁₀ es NH₂. En otra realización, R₁₀ es NH-alquilo.

En una realización, R₃ y/o R₄ es un alquilo. En otra realización, R₃ y/o R₄ es un arilo. En otra realización, R₃ y/o R₄ es un alquilo sustituido. En otra realización, R₃ y/o R₄ es un arilo sustituido.



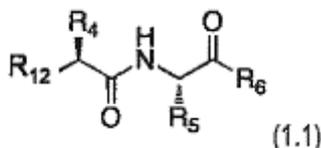
5 En una realización, R₆ es . En otra realización, R₆ es . En otra realización, R₆ es CF₃. En otra realización, R₆ es CO₂H. En otra realización, R₆ es CONH-alquilo. En otra realización, R₆ es CONH-arilo. En otra realización, R₆ es CO-resto de aminoácido.

En una realización W, X, Y y/o Z es N. En otra realización, W, X, Y y/o Z es CH.

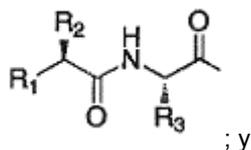
10 En una realización, V y/o U es O. En otra realización, V y/o U es NH. En otra realización, V y/o U es NCH₃. En otra realización, V y/o U es S.

En una realización, R₁₁ es H. En otra realización, R₁₁ es CO₂H. En otra realización, R₁₁ es CONH-alquilo. En otra realización, R₁₁ es CONH-arilo. En otra realización, R₁₁ es arilo. En otra realización, R₁₁ es heteroarilo.

15 En una realización, el compuesto tiene la fórmula (1.1):

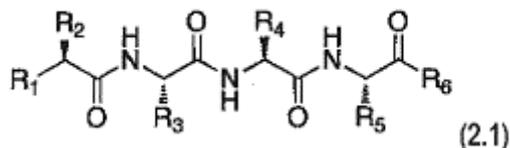


20 en la que R₁₂ es NHR₇, en el que R₇ es;



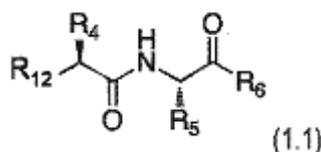
25 en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₈, R₁₀ y R₁₁ son como se han definido anteriormente.

En una realización específica, el compuesto tiene la fórmula (2.1):

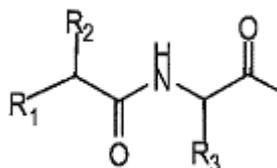


30 en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ son como se han definido anteriormente.

En una realización específica, el compuesto tiene la fórmula (1.1)



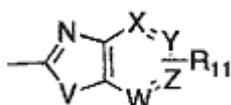
35 o una sal, hidrato, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que



R₁₂ es NHR₇, en el que R₇ es

R₁₃ es NH₂;

5 R₁ es como se ha definido anteriormente, o en una realización específica, R₁ es NH₂;

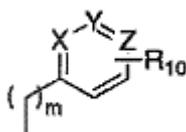


R₆ es

en el que W, X, Y y Z son CH; V es S; y

10 R₁₁ es como se ha definido anteriormente, en una realización específica, R₁₁ es H. En una realización específica de la fórmula 1 como se ha definido anteriormente, todos los restos de aminoácido están en configuración L. En una realización específica, un resto de aminoácido está en configuración D. En una realización específica, el compuesto de fórmula 1 es RQAR-R₆, RQAK-R₆, QAR-R₆ o AR-R₆, en los que todos los aminoácidos están en configuración L.
 15 En una realización específica, el compuesto de fórmula 1 es RQAR-R₆, en el que A es en configuración D y R, R y R están en configuración L.

En otra realización específica del compuesto de la presente invención, (i) R₁ es -H o -NH₂;



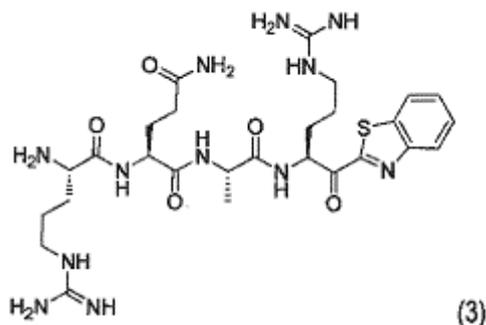
20 (ii) R₂ es ; (iii) m es 1; (iv) W es CH; (v) X es CH; (vi) Y es CH; (vii) R₁₀ es -C(=NH)NH₂; o (viii) cualquier combinación de (i) a (vii).

En otra realización específica del compuesto de la presente invención, (i) R₁ es -NH₂; (ii) R₂ es -CH₂-R₈; (iii) R₃ es un alquilo sustituido; (iv) R₄ es un alquilo; (v) R₅ es -CH₂-R₈;

25 (vi) R₆ es ; (vii) R₈ es -(CH₂)₃NH(C=NH)NH₂; (viii) W es CH; (ix) X es CH; (x) Y es CH; (xi) Z es CH; (xii) V es S; (xiii) R₁₁ es H; o (xiv) cualquier combinación de (i) a (xiii).

30 En otra realización específica del compuesto de la presente invención, R₃ es alquilo sustituido, que está sustituido con (CO)NH₂, (CO)OH, NH₂, NHCO-alquilo, NHCO-arilo, NHSO₂-alquilo, NHSO₂-arilo o heteroarilo. En otra realización específica del compuesto de la presente invención, R₄ es -CH₃. En otra realización específica del compuesto de la presente invención, R₂ y R₅ tienen la configuración (S).

35 En otra realización específica del compuesto de la presente invención, el compuesto tiene la fórmula (3):



DEFINICIONES

5 Los artículos "un", "uno" y "el" en el presente documento se usan para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo.

El uso del término "un", "uno" y "el" cuando se usan en conjunto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede hacer referencia a "uno" pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno".

10 . Como se usa en la presente memoria descriptiva y en la reivindicación o reivindicaciones, las expresiones "que comprende" (y cualquier forma de "que comprende", tal como "comprender" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de "que tiene", tal como "tener" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de "que incluye", tal como "incluye" e "incluir") o "que contiene" (y cualquier forma de "que contiene", tal como "contiene" y "contener") son inclusivas y de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas del método sin mencionar, adicionales y se usan indistintamente con las expresiones "que incluyen, pero no se limitan a" y "que comprenden, pero no se limitan a".

Compuesto

20 Como se usa en el presente documento, los términos "molécula", "compuesto" y "agente" se usan indistinta y ampliamente para hacer referencia a moléculas o compuestos naturales, sintéticos o semisintéticos. Por lo tanto el término "compuesto" representa, por ejemplo, agentes químicos, macromoléculas, extractos celulares o tisulares (de plantas o animales) y similares. Los ejemplos no limitantes de compuestos incluyen péptidos con anticuerpos, carbohidratos, moléculas de ácido nucleico y agentes farmacéuticos. El compuesto se puede seleccionar e identificar sistemáticamente mediante una diversidad de medios que incluyen identificación sistemática aleatoria, selección racional y mediante diseño racional usando, por ejemplo, métodos de modelado de ligandos tales como modelado informático. Tal como entenderá la persona con experiencia en la materia, las moléculas que tienen modificaciones de origen no natural también están dentro del alcance del término "compuesto". Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden modificar para aumentar su actividad, estabilidad, y/o biodisponibilidad, y también para disminuir su toxicidad. Los compuestos o moléculas identificados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención tienen un valor terapéutico en enfermedades o afecciones relacionadas con infecciones microbianas, incluyendo infecciones por Ortomixovirus tales como infección por gripe.

35 Los compuestos de la presente invención pueden incluir alquilo, arilos, alquilo sustituido y arilos sustituidos.

40 Como se usa en el presente documento el término "alquilo" se refiere a alquilo (C₁ a C₁₂) lineal o ramificado, cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir. En una realización, el alquilo es un alquilo de C₁ a C₁₀, y en una realización más específica C₁-C₆ o C₁ a C₃. cada vez que en el presente documento aparezca un intervalo numérico, tal como "de 1 a 12" o "C₁-C₁₂", se refiere a cada número entero en el intervalo dado; por ejemplo, "alquilo C₁-C₁" se refiere a que un grupo alquilo puede comprender solamente 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta e incluyendo 12 átomos de carbono, aunque el término "alquilo" también incluye casos en los que no se designa un intervalo numérico de átomos de carbono. "Alquilo sustituido" se refiere a restos de alquilo que portan sustituyentes seleccionados generalmente entre alquilo, alquenilo, alquinilo, hidroxilo, alcoxi, amida, haluro, heterocíclico, arilo, arilo sustituido (con sustituyentes en cualquiera o en todas las posiciones del arilo posibles que incluyen, pero no se limitan a hidroxilo, amida, haluros, nitrilo, nitro, alquilo, amino, amidas, sulfonamidas), guanidina, amidina, heteroarilo, ariloxi, halógeno, haloalquilo, ciano, nitro, amino (-NH₂), alquilamino inferior, dialquilamino inferior, amido (-CO)NR₆, azido, acil (-CO)R₆, alcoximetilo, mercapto (-S-R₆), sulfoxi (-SO-R₆), sulfonilo -(SO)₂-R₆, sulfonamida -(S(O)₂N(R₆)₂), carbonato (-O(CO)-O-R₆), oxiacilo (-O(CO)-R₆), carboxilo (-CO₂H), éster (-CO)OR₆, carbamato (-O(CO)-N(R₆)₂), en los que R₆ es H o alquilo inferior, alquenilo inferior, alquinilo inferior, arilo, heteroarilo, heterociclo, y similares. Como se usa en el presente documento, "alquilo inferior" se refiere a restos alquilo que tienen de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, por ejemplo de 1 a 3 átomos de carbono. Más preferentemente, el sustituyente es un alquilo, arilo, -(CO)NH₂, -(CO)OH, -NH₂, NHCOalquilo, NHCOarilo, NHSO₂alquilo, NHSO₂arilo y heteroarilo, guanidina, amidina, haluro, OH, OCH₃, NO₂, NH₂ o CO₂H. Alquilo, arilo,

alquilo sustituido y arilo sustituidos cómo se usan en el presente documento incluyen las cadenas laterales de aminoácidos naturales y no naturales. Por lo tanto, en realizaciones específicas, R₂, R₃, R₄ y/o R₅ son cadenas laterales de aminoácidos naturales/convencionales o no naturales/no convencionales. En una realización, R₂ y/o R₅ es una cadena lateral de arginina, lisina, histidina o un análogo/sustituto de la misma tal como ornitina o citrulina. En una realización, R₄ es una cadena lateral de alanina, valina, isoleucina, leucina, o un análogo/sustituto del mismo. En una realización, R₄ es una cadena lateral de glutamina, alanina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico, serina, homoserina, ácido alfa-amino adípico, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina, piridilalanina, tienilalanina, tiazolilalanina, furilalanina, naftilalanina, estando la cadena lateral sustituida o no con alcoxi, hidroxilo, haluro, aminoalquilo, amida, sulfonamida, arilo, alquilo, heteroarilo o amidina. En una realización, al menos uno o más (por ejemplo, 2, 3 o 4) restos de aminoácido del compuesto está en configuración L. En una realización, al menos uno o más (por ejemplo, 2, 3 o 4) restos de aminoácido del compuesto está en configuración D. A menos que se indique de otro modo, tal como se usa en el presente documento en las expresiones "CONH-resto(s) de aminoácido" y "CO-resto(s) de aminoácido" se usan indistintamente: el NH de "CONH" es el del resto de aminoácido unido con línea al CO.

Como se usa en el presente documento, "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal, de cadena ramificada o cíclicos que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono, y que están en el intervalo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 100 átomos de carbono, por ejemplo de 2 a 12 átomos de carbono, y "alquenilo sustituido" se refiere a grupos alquenilo que cortan adicionalmente uno o más sustituyentes como se ha establecido anteriormente. Como se usa en el presente documento, "alquenilo inferior" se refiere a restos alquenilo que tienen de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, por ejemplo de 1 a 3 átomos de carbono.

Como se usa en el presente documento, "alquinilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, y que están en el intervalo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 100 átomos de carbono, por ejemplo de 2 a 12 átomos de carbono y "alquinilo sustituido" se refiere a grupos alquinilo que portan adicionalmente uno o más sustituyentes como se ha establecido anteriormente. Como se usa en el presente documento, "alquinilo inferior" se refiere a de restos alquinilo que tienen de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, por ejemplo 2, 3 o 4 carbonos.

Como se usa en el presente documento el término "arilo" se refiere a arilo (C₅ a C₁₄ (por ejemplo, C₅-C₆)) sustituido o sin sustituir. "Ariilo sustituido" se refiere a grupos arilo que portan adicionalmente uno o más sustituyentes como se ha establecido anteriormente en la definición de "alquilo sustituido" mencionado anteriormente. En una realización más específica, el sustituyente es un alquilo, un heterociclo, un haluro, SH, OH, OCH₃, NO₂, NH₂, CO₂H, CONH₂ o SO₂NH₂.

Como se usa en el presente documento la expresión "resto de aminoácido" se refiere a cualquier resto de aminoácido natural/convencional y no natural/no convencional en configuración (L) o (D), e incluye alfa aminoácidos o alfa-aminoácidos disustituidos. Se refiere a isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, arginina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, prolina, serina, tirosina. También incluye beta-alanina, ácido 3-amino-propiónico, ácido 2,3-diamino propiónico, ácido alfa-aminoisobutírico (Aib), ácido 4-amino-butírico, *N*-metilglicina (sarcosina), hidroxiprolina, ornitina (por ejemplo, L-ornitina), citrulina, *t*-butilalanina, *t*-butilglicina, *N*-metilisoleucina, fenilglicina, ciclohexilalanina, ciclopentilalanina, ciclobutilalanina, ciclopropilalanina, ciclohexilglicina, ciclopentilglicina, ciclobutilglicina, ciclopropilglicina, norleucina (Nle), norvalina, 2-naftilalanina, piridilalanina, 3-benzotienil alanina, 4-clorofenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina, 4-fluorofenilalanina, penicilamina, ácido 1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico, beta-2-tienilalanina, sulfóxido de metionina, L-homoarginina (hArg), *N*-acetil lisina, ácido 2-amino butírico, ácido 2-amino butírico, ácido 2,4-diaminobutírico (D- o L-), *p*-aminofenilalanina, *N*-metilvalina, selenocisteína, homocisteína, homoserina (HoSer), ácido cisteico, ácido épsilon-amino hexanoico, ácido delta-amino valérico, o ácido 2,3-diaminobutírico (D- o L-), etc. Estos aminoácidos se conocen bien en la técnica de bioquímica/química de péptidos. De forma análoga, la expresión "cadena lateral de aminoácido" se refiere a la cadena lateral de cualquier resto de aminoácido natural/convencional y no natural/no convencional en configuración (L) o (D) como se ha descrito anteriormente.

Los compuestos de la presente invención que incluyen péptidos pueden comprender la sustitución de al menos uno de los enlaces peptídicos con una modificación isostérica. Los compuestos de la presente invención que incluyen péptidos pueden ser peptidomiméticos. Por lo general un peptidomimético se caracteriza por mantener la polaridad, tamaño tridimensional y funcionalidad (bioactividad) de su equivalente peptídico, pero en el que uno o más de los enlaces/uniones peptídicos se han sustituido, a menudo por enlaces proteolíticamente más estables. Generalmente, el enlace que sustituye al enlace amida (sustituto de enlace amida) conserva muchas o todas las propiedades del enlace amida, por ejemplo conformación, volumen estérico, carácter electrostático, potencial para formación de enlaces de hidrógeno, etc. Las sustituciones de enlace peptídico habituales incluyen ésteres, poliaminas y derivados de los mismos así como alcanos sustituidos y alquenos, tales como aminometilo y cetometileno. Por ejemplo, el péptido puede tener uno o más enlaces peptídicos sustituidos por enlaces tales como -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (*cis* o *trans*), -CH₂SO-, -CH(OH)CH₂- o -COCH₂-, -N-NH-, -CH₂NHNH-, o enlaces peptoides en los que la cadena lateral se conecta al átomo de nitrógeno en lugar del átomo de carbono. Los peptidomiméticos de ese tipo pueden tener mayor estabilidad química, mejores propiedades biológicas/farmacológicas (por ejemplo, semivida,

absorción, potencia, eficacia, etc.) y/o reducción de la antigenicidad con respecto a su equivalente peptídico.

Sales, ésteres, hidratos y solvatos

- 5 Los compuestos de la presente invención incluyen sales farmacológicamente aceptables y derivados de éster de los mismos así como hidratos o solvatos de los mismos y todas las formas estereoisoméricas de los compuestos mencionados. Los compuestos y los ésteres farmacológicamente aceptables de los mismos de la presente invención pueden formar sales farmacológicamente aceptables si fuera necesario.

10 Sales

La expresión "sal farmacológicamente aceptable del mismo" se refiere a una sal en la que se pueden convertir los compuestos de la presente invención. Los ejemplos preferentes de una sal de ese tipo incluyen sales de metales alcalinos, tales como una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de litio, sales de magnesio o calcio; sales de metales alcalinotérreos, tales como una sal de calcio y una sal de magnesio; sales metálicas tales como una sal de aluminio, una sal de hierro, una sal de cinc, una sal de cobre, una sal de níquel y una sal de cobalto; sales de amina tales como sales inorgánicas que incluyen una sal de amonio; sales orgánicas o sales de amonio tales como una sal de t-octilamina, una sal de dibencilamina, una sal de morfolina, una sal de glucosamina, una sal de éster de fenilglicina alquilo, una sal de etilendiamina, una sal de N-metilglucamina, una sal de guanidina, una sal de dietilamina, una sal de trietilamina, una sal de dicitlohexilamina, una sal de N,N'-dibenciletilendiamina, una sal de cloroprocaína, una sal de procaína, una sal de dietanolamina, una sal de N-bencil-fenetilamina, una sal de piperazina, una sal de tetrametilamonio y una sal de tris(hidroximetil)aminometano; sales de ácido inorgánico tales como sales de ácido hidrohálico tales como un fluorhidrato, un clorhidrato, un bromhidrato o un yodhidrato, un nitrato, un perclorato, un sulfato o un fosfato; alcanosulfonatos inferiores tales como un metanosulfonato, trifluorometanosulfonato o un etanosulfonato; arilsulfonatos tales como un benzenosulfonato o un p-toluenosulfonato y similares, que no son tóxicas para los organismos vivos; sales de ácido orgánico tales como un acetato, un malato, adipato, un fumarato, un succinato, un citrato, alginato, ascorbato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, cinamato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, itaconato, lactato, maleato, mandelato, sulfonato, metanosulfonato, trifluorometanosulfonatos, etanosulfonatos 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, tartrato, tiocianato, tosilato, ácido trifluoroacético, undecanoato, un tartrato, un oxalato o un maleato; y sales de aminoácido tales como una sal de glicina, una sal de lisina, una sal de arginina, una sal de ornitina, histidina, un glutamato o una sal de aspartato. Además, los grupos que contienen nitrógeno básicos se pueden cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo incluyendo sulfato de dimetilo, dietilo, y dibutilo; y sulfatos de diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo incluyendo bromuros de bencilo y fenetilo y otros. para ejemplos adicionales, véase S. M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19. Los expertos en la materia pueden formar las sales de ese tipo de forma bastante rápida usando técnicas convencionales.

Los ejemplos preferentes de las sales formadas por un grupo ácido presentes en los compuestos de la presente invención incluyen sales de metales tales como sales de metal alcalino (por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio y sales de litio), sales de metal alcalinotérreo (por ejemplo, sales de calcio y sales de magnesio), sales de aluminio y sales de hierro; sales de amina tales como sales de amina inorgánica (por ejemplo, sales de amonio) y sales de amina orgánica (por ejemplo, sales de t-octilamina, sales de dibencilamina, sales de morfolina, sales de glucosamina, sales de éster de fenilglicinaalquilo, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de guanidina, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de dicitlohexilamina, sales de N,N'-dibenciletilendiamina, sales de cloroprocaína, sales de procaína, sales de dietanolamina, sales de N-bencilfenetilamina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio y sales de tris(hidroximetil)aminometano; y sales de aminoácido tales como sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina, sales de ornitina, glutamatos y aspartatos.

Se pretende que todas las sales sean sales farmacéuticamente aceptables dentro del alcance de la invención y todas las sales se consideran equivalentes a las formas libres de los compuestos correspondientes para fines de la invención.

Ésteres

Los ésteres fisiológicamente/farmacéuticamente aceptables también son útiles como medicamentos activos. La expresión "ésteres farmacéuticamente aceptables" incluye ésteres de los compuestos de la presente invención, en los que los grupos hidroxilo (por ejemplo, en ácido carboxílico) se han convertido en los ésteres correspondientes y pueden actuar como un profármaco que, cuando se absorbe en el torrente sanguíneo de un animal de sangre caliente, se puede escindir un modo tal como para liberar en la forma farmacológica y permitir que el fármaco proporcione un aumento de la eficacia terapéutica. Los ésteres de ese tipo se pueden formar con ácidos inorgánicos y orgánicos tales como ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido maleico, ácido acético, ácido succínico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y similares, que no son

tóxicos para los organismos vivos. Los ejemplos adicionales son los ésteres con ácidos alifáticos o aromáticos tales como ácido acético o con alcohol alifático (por ejemplo, ésteres de alquilo, incluyendo ésteres de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo o pentilo, y similares) o alcoholes aromáticos (por ejemplo, éster de bencilo).

- 5 Los ésteres se pueden preparar a partir de sus ácidos o sales correspondientes mediante una diversidad de métodos conocidos para las personas con experiencia en la materia, tales como, por ejemplo, transformando en primer lugar el ácido en el cloruro de ácido y a continuación haciendo reaccionar el cloruro de ácido con un alcohol adecuado. Otros métodos adecuados para la preparación de ésteres al se describen en Kemp y Vellaccio, 1980.
- 10 Cuando los ésteres de la invención tienen un grupo básico, tal como un grupo amino, el compuesto se puede convertir en una sal haciendo que reaccione con un ácido, y en el caso en el que los ésteres tienen un grupo ácido, tal como un grupo sulfonamido, el compuesto se prevé convertir en una sal haciendo que reaccione con una base. Los compuestos de la presente invención incluyen sales de ese tipo.
- 15 Las sales y los ésteres de los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante métodos conocidos usando materiales de partida o compuestos intermedios apropiados que es están fácilmente disponibles y/o se describen en el presente documento.

20 Generalmente, una sal deseada de un compuesto de la presente invención se puede preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de un compuesto con medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una sal deseada se puede preparar haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre o de ácido libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, o base orgánica o inorgánica adecuada, respectivamente, y aislando la sal formada de ese modo. En el caso de compuestos básicos, por ejemplo, la base libre se trata con HCl anhidro en un disolvente adecuado tal como THF, y la sal se aísla en forma de una sal de clorhidrato. En el caso de concursos ácidos, las sales se pueden obtener, por ejemplo, por tratamiento del ácido libre con amoniaco anhidro en un disolvente adecuado tal como éter y aislando posteriormente la sal de amonio. Estos métodos son convencionales y podrían ser rápidamente evidentes para alguien con experiencia en la materia.

30 Los compuestos de la presente invención se pueden esterificar mediante una diversidad de procedimientos convencionales que incluyen hacer reaccionar el anhídrido, ácido carboxílico o cloruro de ácido apropiado con el grupo alcohol de un compuesto de la presente invención. Se hace que el anhídrido apropiado reaccione con el alcohol en presencia de una base para facilitar la acilación tal como 1,8-bis(dimetilamino)naftaleno o N,N-dimetilaminopiridina. O, se hace que un ácido carboxílico apropiado reaccione con el alcohol en presencia un agente deshidratante tal como dicitohexilcarbodiimida, 1-[3-dimetilaminopropil]-3-etilcarbodiimida u otros agentes deshidratantes solubles en agua que se usaron para conducir la reacción mediante la eliminación de agua, y, opcionalmente, un catalizador de acilación. La esterificación también se puede realizar usando el ácido carboxílico apropiado en presencia de anhídrido trifluoroacético y, ocasionalmente, piridina, o en presencia de N,N-carbonildiimidazol con piridina. La reacción de un cloruro de ácido con el alcohol se puede realizar con un catalizador de acilación tal como 4-DMAP o piridina.

40 Un experto en la materia podría saber fácilmente cómo llevar a cabo de forma satisfactoria éstos así como otros métodos de esterificación de alcoholes conocidos.

45 Profármacos y solvatos

En el presente documento también se contemplan profármacos y solvatos de los compuestos de la invención. Una discusión de profármacos la proporcionan T. Higuchi y V. Stella, en Pro-drugs as Novel Delivery Systems (1987) 14 of the A.C.S. Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, (1987) Edward B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press. El término "profármaco" se refiere a un compuesto (por ejemplo, un precursor de fármaco) que se transforma *in vivo* para producir un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato del compuesto. La transformación se puede producir mediante diversos mecanismos (por ejemplo, mediante procesos metabólicos o químicos), tales como, por ejemplo, a través de hidrólisis en sangre. Una discusión del uso de pro fármacos la proporcionan T. Higuchi y W. Stella, en "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

60 Por ejemplo, si un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato del compuesto contiene un grupo funcional ácido carboxílico, un profármaco puede comprender un éster formado por la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo ácido con un grupo tal como, por ejemplo, alquilo (C₁-C₈), alcanoiloximetilo (C₂-C₁₂), 1-(alcanoiloxi)etilo que tiene de 4 a 9 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcanoiloxi)-etilo que tiene de 5 a 10 átomos de carbono, alcoxicarboniloximetilo que tiene de 3 a 6 átomos de carbono, 1-(alcoxicarboniloxi)etilo que tiene de 4 a 7 átomos de carbono, 1-metil-1-(alcoxicarboniloxi)etilo que tiene de 5 a 8 átomos de carbono, N-(alcoxicarbonil)aminometilo que tiene de 3 a 9 átomos de carbono, 1-(N-(alcoxicarbonil)amino)etilo que tiene de 4 a 10 átomos de carbono, 3-ftalidilo, 4-crotonolactonilo, gamma-butirolacton-4-ilo, di-N,N-alquilamino (C₁-C₂)alquilo (C₂-C₃) (tal como β-dimetilaminoetilo), carbamoil-alquilo (C₁-C₂), N,N-dialquilcarbamoil (C₁-C₂)-alquilo (C₁-C₂) y piperidino-, pirrolidino- o morfolinoalquilo (C₂-C₃), y similares.

De forma análoga, si un compuesto de la presente invención contiene un grupo funcional alcohol, un profármaco se puede formar mediante la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo alcohol con un grupo tal como, por ejemplo, alcanoiloxi (C₁-C₆)metilo, 1-(alcanoiloxi (C₁-C₆))etilo, 1-metil-1-(alcanoiloxi (C₁-C₆))etilo, alcoxicarboniloxi (C₁-C₆)metilo, N-alcoxi(C₁-C₆)carbonilaminometilo, succinoílo, alcanoil (C₁-C₆), α-aminoalcanilo (C₁-C₄), arilacilo y α-aminoacilo, o α-aminoacil-α-aminoacilo, en los que cada grupo α-aminoacilo se selecciona independientemente entre los L-aminoácidos de origen natural, P(O)(OH)₂, -P(O)(O(C₁-C₆))alquil)₂ o glicosilo (el radical que resulta de la retirada de un grupo hidroxilo de la forma hemiacetal de un carbohidrato), y similares.

Si un compuesto de la presente invención incorpora un grupo funcional amino una amina, un profármaco se puede formar mediante la sustitución de un átomo de hidrógeno en el grupo amino con un grupo tal como, por ejemplo, R-carbonilo, RO-carbonilo, NRR'-carbonilo en los que R y R' son cada uno independientemente alquilo (C₁-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₇), bencilo, o R-carbonilo es un α-aminoacilo natural o α-aminoacilo natural, -C(OH)C(O)OY₁ en el que Y₁ es H, alquilo (C₁-C₆) o bencilo, -C(OY₂)Y₃ en el que Y₂ es alquilo (C₁-C₄) e Y₃ es alquilo (C₁-C₆), carboxi alquilo (C₁-C₆), aminoalquilo (C₁-C₄) o mono-N- o di-N,N-alquilamino (C₁-C₆)alquilo, -C(Y₄)Y₅ en el que Y₄ es H o metilo e Y₅ es mono-N- o di-N,N-alquilamino (C₁-C₆)morfolino, piperidin-1-ilo o pirrolidin-1-ilo, y similares.

Uno o más compuestos de la invención pueden existir en forma sin solvatar así como formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol, y similares, y se pretende que la invención incluya formas tanto solvatadas como sin solvatar. "Solvato" se refiere a una asociación física de un compuesto de la presente invención con una o más moléculas de disolvente. Esta asociación física implica grados variables de enlace iónico y covalente, incluyendo enlace de hidrógeno. En ciertos casos el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. "Solvato" incluye solvatos en fase de solución y aislables. Los ejemplos no limitantes de solvatos adecuados incluyen etanolatos, metanolatos, y similares. Un "Hidrato" es un solvato en el que la molécula de disolvente es H₂O.

Generalmente se conoce la preparación de solvatos. Por lo tanto, por ejemplo, M. Caira *et al.*, J. Pharmaceutical Sci., 93 (3), 601-611 (2004) describen la preparación de los solvatos del fluconazol antifúngico en acetato de etilo así como a partir de agua. E. C. van Tonder *et al.*, describen preparaciones similares de solvatos, hemisolvato, hidratos y similares en AAPS Pharm Sci Tech., 5 (1), artículo 12 (2004); y A. L. Bingham *et al.*, Chem. Commun., 603-604 (2001). Un proceso no limitante, habitual implica la disolución del compuesto de la invención en cantidades deseadas del disolvente deseado (orgánico o agua o mezclas de los mismos) a una temperatura más elevada que la temperatura ambiente, y enfriando la solución a una tasa suficiente como para formar cristales que a continuación se aíslan con métodos convencionales. Las técnicas analíticas tales como, por ejemplo espectroscopía de I. R., muestran la presencia del disolvente (o agua) en los cristales en forma de un solvato (o hidrato).

Hidratos

Como se usa en el presente documento, la expresión "hidrato farmacéuticamente aceptable" se refiere a los compuestos de la presente invención cristalizados con una o más moléculas de agua para formar una forma hidratada.

Estereoisómeros, diastereómeros, enantiómeros, racematos, tautómeros

Los compuestos de la presente invención tienen átomos de carbono asimétricos y pueden existir en forma de diastereómeros, enantiómeros ópticamente puros o como racematos. El término "compuesto" como se usa en el presente documento incluye todas estas formas.

Los diastereómeros (en ocasiones denominados diastereoisómeros) son estereoisómeros que no son enantiómeros. La diastereomería se produce cuando dos o más estereoisómeros de un compuesto tienen diferentes configuraciones en uno o más (pero no en todos) de los centros estereogénicos equivalentes (relacionados) y no son imágenes especulares entre sí. Cuando dos diastereoisómeros se diferencian entre sí solamente en un centro estereogénico, éstos son epímeros. Cada centro estereogénico da lugar a dos configuraciones diferentes y por lo tanto a dos estereoisómeros diferentes.

Los diastereómeros se diferencian de los enantiómeros en que en los últimos son pares de estereoisómeros que se diferencian en todos los centros estereogénicos y por lo tanto son imágenes especulares entre sí. Los enantiómeros de un compuesto con más de un centro estereogénico también son diastereómeros de los otros estereoisómeros de ese compuesto que no son su imagen especular. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas y diferente actividad, a diferencia de los enantiómeros. Los diastereómeros de la presente invención incluyen tomatidina y 3 alfa-hidroxi-tomatidina por ejemplo.

Para fines de la presente memoria descriptiva, "tautómero farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier forma tautomérica de cualquier compuesto de la presente invención.

La purificación de enantiómeros y la separación de mezclas isoméricas de un compuesto de la presente invención se prevé conseguir mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica.

Inhibidores de matriptasa para tratamiento de infecciones por ortomixovirus

La presente invención se refiere adicionalmente al uso de unido de matriptasa, es decir, un agente que disminuye la expresión y/o la actividad de matriptasa, en células diana. Los inhibidores de ese tipo pueden ser útiles para el tratamiento de infecciones por ortomixovirus, tales como infecciones por gripe. El inhibidor es un compuesto que se ha definido anteriormente.

Agentes para ARN de interferencia (ARNsi, ARNsh, ARNmi)

La presente divulgación también proporciona el uso de ARN interferencia (ARNi) para disminuir la expresión/actividad de matriptasa en células diana (por ejemplo, células epiteliales respiratorias). "ARN de interferencia" se refiere al proceso de supresión de expresión genética específica de secuencias mediada por moléculas de ARN tales como ARN de interferencia pequeño (ARNsi), microARN (ARNmi) o ARN horquillado pequeño/corto (ARNsh) sin supresión generalizada de síntesis de proteínas. El ARNi puede implicar la degradación de ARN mensajero (por ejemplo, ARNm de matriptasa, tal como un ARNm que comprende una secuencia que corresponde a la secuencia de SEQ ID NO: 1) con un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), evitando que previene la traducción del ARNm diana transcrito. Como alternativa, puede implicar la metilación de ADN genómico, que desconecta la transcripción de un gen diana. La supresión de la expresión genética causada por ARNi puede ser transitoria o puede ser más estable, incluso permanente.

El ARN interferencia se acciona por la presencia de los ARN interferencia cortos de aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud que comprenden híbridos de aproximadamente 19 pares de bases. Estos ARNsi pueden ser de origen sintético o se puede obtener a partir de una actividad de ribonucleasa III (por ejemplo, ribonucleasa dicer) encontrada en células. La respuesta del ARNi también presenta un complejo de endonucleasa que contiene ARNsi, comúnmente denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media la escisión de ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la región anti sentido del híbrido de ARNsi. La escisión del ARN diana (por ejemplo, ARNm de matriptasa) se produce en la parte media de la región complementaria a la hembra antisentido del híbrido de ARNsi (Elbashir *et al.*, 2001, Genes Dev., 15: 188).

"ARN interferencia pequeño" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de mediar el ARN de interferencia "ARNi" o silenciamiento genético (véase por ejemplo, Bass, 2001, Nature, 411: 428-429; Elbashir *et al.*, 2001, Nature, 411: 494-498; Kreuzer *et al.*, publicación de PCT Internacional N.º WO 00/44895; Zernicka-Goetz *et al.*, publicación de PCT Internacional N.º WO 01/36646; Fire, publicación de PCT Internacional N.º WO99/32619; Mello and Fire, publicación de PCT Internacional N.º WO01/29058; Deschamps-Depaillette, publicación de PCT Internacional N.º WO99/07409; Han *et al.*, publicación de PCT Internacional N.º WO 2004/011647; Tuschl *et al.*, publicación de PCT Internacional N.º WO 02/44321; y Li *et al.*, publicación de PCT Internacional N.º WO 00/44914). Las realizaciones específicas de ARNsi son moléculas de ARN bicatenario con una longitud de aproximadamente diez a aproximadamente 30 nucleótidos que se nombran por su capacidad para interferir de forma específica con la expresión de proteínas. En una realización, el ARNsi tiene una longitud de 12-28 nucleótidos, más preferentemente una longitud de 15-25 nucleótidos, incluso más preferentemente una longitud de 19-23 nucleótidos y lo más preferentemente una longitud de 21-23 nucleótidos. Por lo tanto, el ARNsi preferente tiene una longitud de aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos. Como se usa en el presente documento, no es necesario que las moléculas de ARNsi se limiten a las moléculas que contienen solamente ARN, sino que en su hogar incluyen nucleótidos y no nucleótidos químicamente modificados. Los ARNsi usados en los ejemplos en el presente documento incluyen ST14 de símbolo genético de los ARNsi Seleccionados s13520 (Ambion) Silencer®, y S2: ST14 humano de dirección a ARNsi EHU012511 (Sigma-Aldrich) MISSION® (esiRNA1).

La longitud de una hebra designa la longitud de una molécula de ARNsi. Por ejemplo, un ARNsi que se describe como con una longitud de 23 ribonucleótidos (una unidad monomérica de 23 meros) podría comprender dos hebras opuestas de ARN que se indican entre sí para formación de 21 pares de bases contiguas. Los dos ribonucleótidos restantes en cada hebra podrían formar lo que se denomina un "saliente". En una realización particular, el ARNsi contiene dos hebras de diferentes longitudes. En este caso, la hebra más larga designa la longitud del ARNsi. Por ejemplo, un ARNds que contiene una hebra que tiene una longitud de 20 nucleótidos y una segunda hebra que tiene una longitud de 19 nucleótidos se considera una unidad monomérica de 20 meros.

Los ARNsi que comprenden un saliente son deseables. El saliente puede estar en el extremo en la posición 3' o 5' terminal. Preferentemente, los salientes encuentran en el extremo en la posición 3' terminal de una hebra de ARN. La longitud de un saliente puede variar, pero preferentemente tiene una longitud de aproximadamente 1 a 5 Nucleótidos. Generalmente, los ARNsi de 21 nucleótidos con un saliente en la posición 3' con dos nucleótidos son los ARNsi más activos.

Los ARNsi se diseñan para disminuir la expresión de matriptasa en una célula diana con ARN de interferencia. Los ARNsi comprenden una región codificante y una región no codificante en la que la región no codificante comprende una secuencia complementaria a una secuencia de ARNm de matriptasa y la región codificante comprende una secuencia complementaria a la secuencia no codificante del ARNm de matriptasa. Una molécula de ARNsi se puede

ensamblar a partir de los fragmentos de ácido nucleico en la que un fragmento comprende la región codificante y el segundo fragmento comprende la región no codificante de la molécula de ARNsi. La región codificante y la región no codificante también se pueden conectar de manera covalente a través de una molécula conectora. La molécula conectora puede ser un conector polinucleotídico o un conector no polinucleotídico.

5

Anticuerpos

La presente divulgación también proporciona el uso de anticuerpos que inhiben la actividad de matriptasa en células diana (por ejemplo, células del epitelio respiratorio), por ejemplo, que inhiben la escisión de la gripe HA mediante matriptasa. En una realización, los anticuerpos reconocen/se unen de forma específica a un polipéptido de matriptasa (por ejemplo, el polipéptido de matriptasa de SEQ ID NO: 2). En una realización, los anticuerpos reconocen/se unen de forma específica a un epítipo situado en una región de matriptasa que está implicada en la escisión de la gripe HA (el dominio catalítico), por ejemplo un epítipo situado en la región que se extiende aproximadamente de los restos 615 a 855, por ejemplo aproximadamente los restos 700 a 840 de matriptasa. En una realización, los anticuerpos reconocen/según él de forma específica a un epítipo situado en una región que se extiende aproximadamente desde los restos 708 a 829 de matriptasa. En realizaciones, los anticuerpos reconocen/se unen de forma específica a un epítipo que comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o todos) de los siguientes restos de matriptasa: Phe⁷⁰⁸, Gln⁷⁶³, Asp⁷⁹⁹, Ser⁸⁰⁰, Gln⁸⁰², Gly⁸⁰³, Ser⁸⁰⁵, Gly⁸²⁷, Asp⁸²⁸ y/o Gly⁸²⁹.

20

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, y abarcar anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (por ejemplo, inhibir la unión de matriptasa a la HA de gripe, y/o la escisión mediada por matriptasa de HA de gripe). Los fragmentos de anticuerpo comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente un antígeno de unión o región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos de Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de una sola cadena, anticuerpos de dominio individual (por ejemplo, de camélidos), anticuerpos de un solo dominio NAR de tiburón, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo también se pueden preferir arrestos de unión que comprende las CDR o dominios de unión al antígeno que incluyen, pero no se limitan a, regiones V_H (V_H, V_H-V_H), anticalinas, PepCuerpos, fusiones de epítipo de anticuerpo-linfocito T (Troycuerpos) o Pepticuerpos.

25

En general, en la técnica se conocen bien técnicas para preparar anticuerpos (incluyendo anticuerpos monoclonales e hibridomas) y para detectar antígenos usando anticuerpos (Campbell, 1984, En "Monoclonal Antibody Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Elsevier Science Publisher, Amsterdam, Países Bajos) y en Harlow *et al.*, 1988 (en: Antibody A Laboratory Manual, CSH Laboratories).

35

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales mediante inyecciones subcutáneas (s.c.), intravenosas (i.v.) o intraperitoneales (i.p.) múltiples del antígeno pertinente (por ejemplo, un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de matriptasa) con o sin un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivatización, por ejemplo, maleimidobenzoil sulfosuccinimida éster (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R₁N=C=NR, en el que R y R₁ son grupos alquilo diferentes.

40

Los animales se pueden inmunizar contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados mediante la combinación del antígeno o conjugado (por ejemplo, 100 µg para conejos o 5 µg para ratones) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde Los animales se estimulan con el antígeno o conjugado (por ejemplo, con 1/5 a 1/10 la cantidad original usada para inmunizar) en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde, se extrae sangre a los animales y el suero se somete a ensayo para título de anticuerpo. Los animales se estimulan hasta la meseta del título. Preferentemente, para inmunizaciones con conjugado, el animal se estimula con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden preparar en cultivo celular recombinante como fusiones de proteína de fusión. Además, de forma adecuada se usan agentes de agregación tales como alumbre para aumentar la respuesta inmune.

50

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando el método de hibridoma descrito en primer lugar por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o se pueden preparar con métodos de ADN recombinante (por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.204.023). Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar usando las técnicas que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.025.155 y 6.077.677 así como en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.ºs. 2002/0160970 y 2003/0083293.

60

65

5 En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal con una rata, hámster o mono, se inmuniza (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente en el presente documento) para obtener linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se unen de forma específica al antígeno usado para inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación los linfocitos se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma.

10 Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma precursoras, sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridoma es por lo general incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

15 Los anticuerpos específicos para el dominio catalítico (restos 615 a 855) de matriptasa humana y que presentan actividad inhibitoria contra matriptasa se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.572.444. Los ejemplos de los anticuerpos de ese tipo incluyen los que tienen las secuencias que se representan en la Tabla 1 que sigue a continuación.

20 Tabla 1: Secuencias de anticuerpos anti-matriptasa representativos que se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.572.444

Cadena pesada

| FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|---------------------------|------------|-----------------|-------------------|--------------------|---------------|-------------|
| EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFTFSSYAMS | NVRQAPGKGLIEWVS | AISGSGSTYYADSVKQ | RPTISRDNSENKNTLYLQ | | WGQGTLVTVSS |
| EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAAS | GFTFSSYAMS | NVRQAPGKGLIEWVS | | MNSLRAECTAVYYCAK | | |
| EVQLLESQGGLVQPGGSLRLSCAAS | GVTFSSYAMS | NVRQAPGKGLIEWVS | AISSSGVNTHYADSVKQ | RFTISRDNSENKNTLYLQ | IASIALRGYYFDY | WGQGTLVTVSS |
| | | | | MNSLRAECTAVYYCAT | | |
| | | | AISSSGVNTHYADSVKQ | RFTISRDNSENKNTLYLQ | IASIATRGYFFNY | WGQGTLVTVSS |
| | | | | MNSLRAECTAVYYCAT | | |

Cadena ligera

| FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|--------------------------|---------------|-----------------|---------|------------------|-----------|------------|
| EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC | RASQSVSSSYLA | WYQOKPGQAPRLLIY | GASSRAT | GIPCRPSSGSGTDFT | | FGQGTIVETK |
| EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC | RASQTFGSSSYLA | WYQOKPGQAPRLLIY | | LTISRLEPEDFAVYYC | | |
| DIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSC | RASQIFSSNSLA | WYQOKPGQAPSLLIY | GASSRAT | VIPCRPSSGSGTDFT | QQYGSSPWT | FGQGTIVETK |
| | | | | LTISRLEPEDFAVYYC | | |
| | | | GASSRAT | GIPCRPSSGSGTDFT | QQYGSSPWT | FGQGTIVETK |
| | | | | LTISRLEPEDFAVYYC | | |

Otros anticuerpos de matriptasa se desvelan en Sun *et al.*, 2003, *Biochemistry* **42**: 892-900 y Lin *et al.*, 1997, *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 9147-9152.

Moléculas pequeñas y otros inhibidores de matriptasa

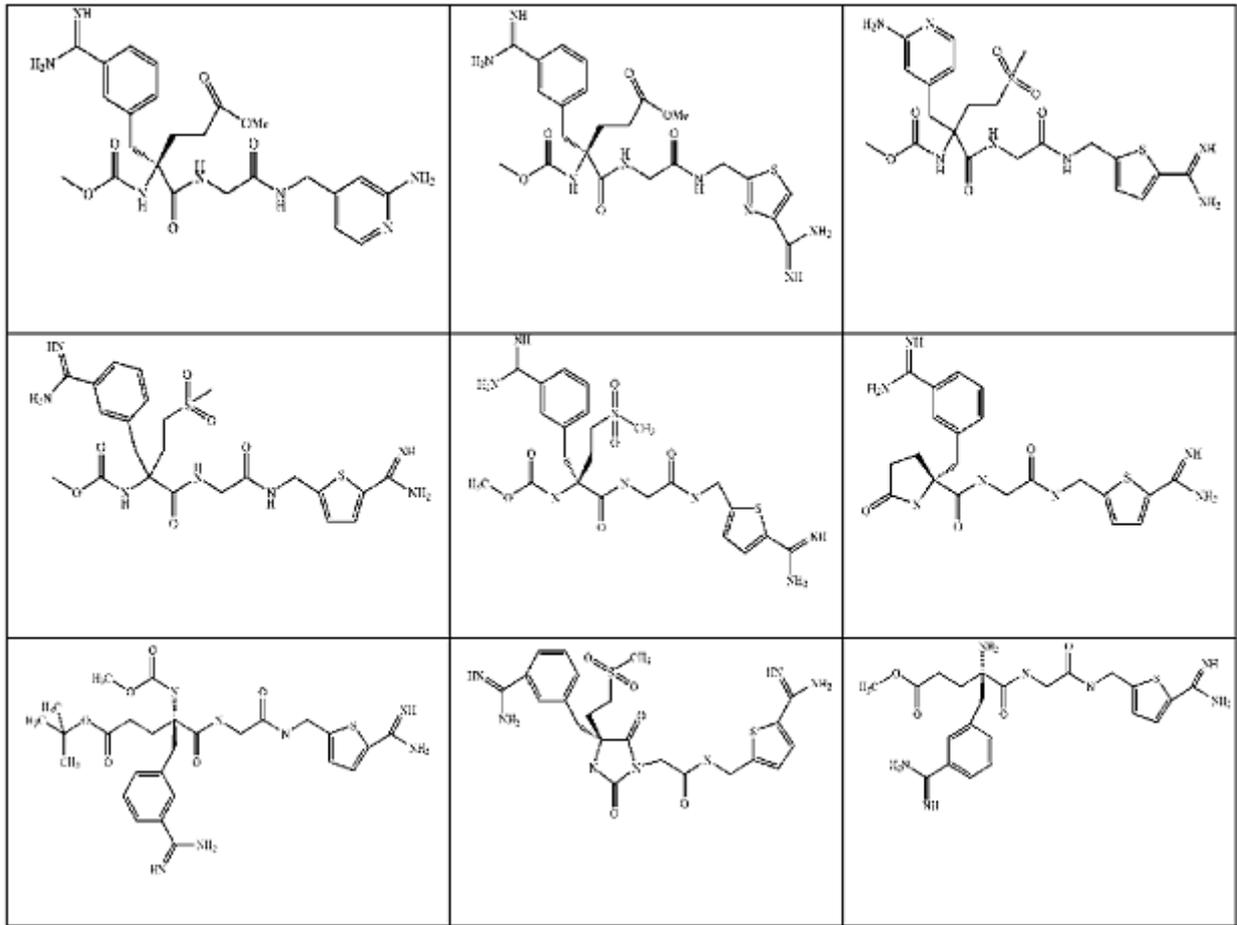
5 Los inhibidores de actividad de matriptasa que se pueden usar incluyen los que se describen en los documentos de patente de Estados Unidos N.ºs. 6.677.377 y 7.019.019. Las estructuras de ejemplos representativos de los inhibidores de ese tipo se presentan en las Tablas 2 y 3 que siguen a continuación:

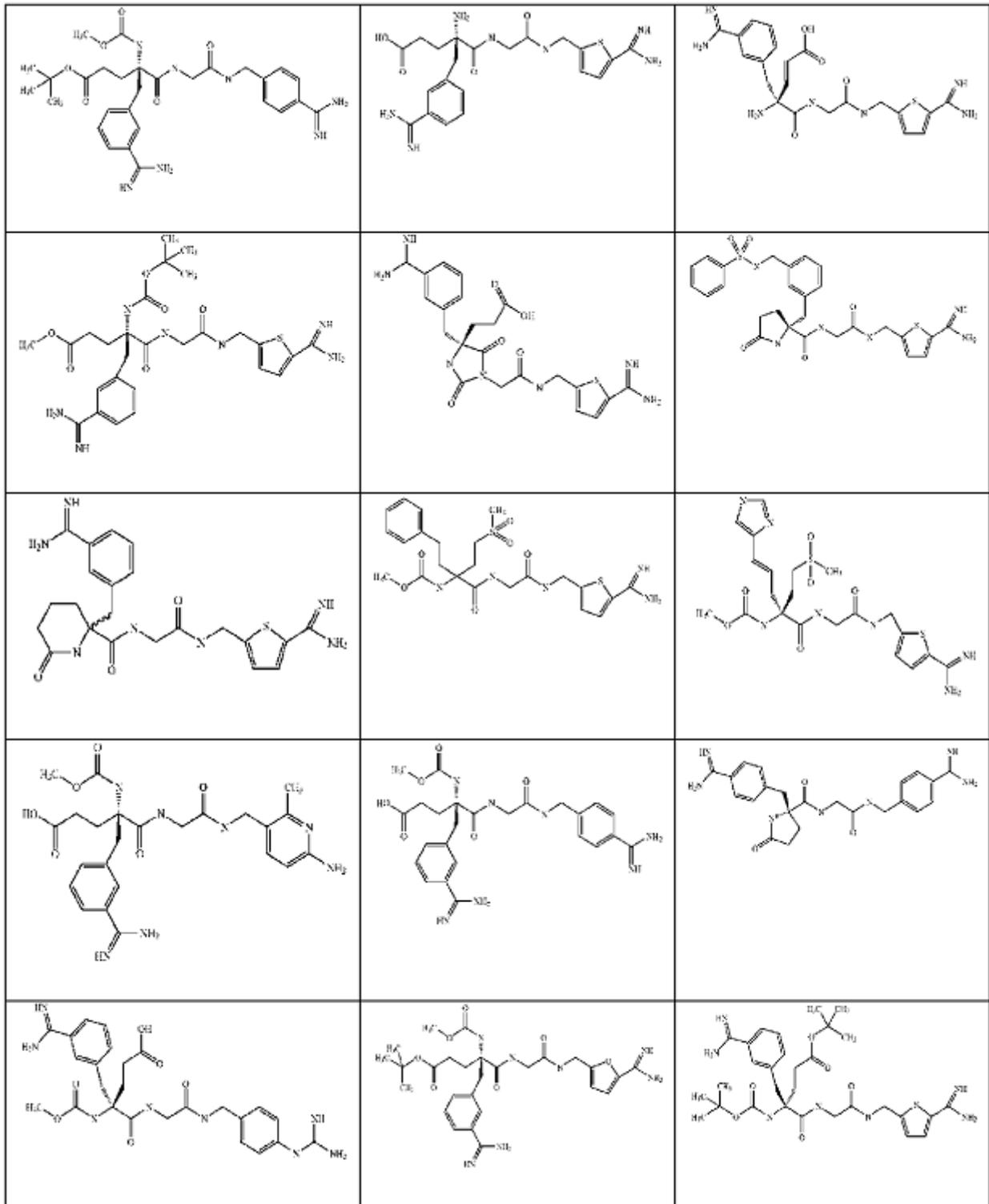
10 Tabla 2: Estructuras de inhibidores de matriptasa representativos que se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.677.377

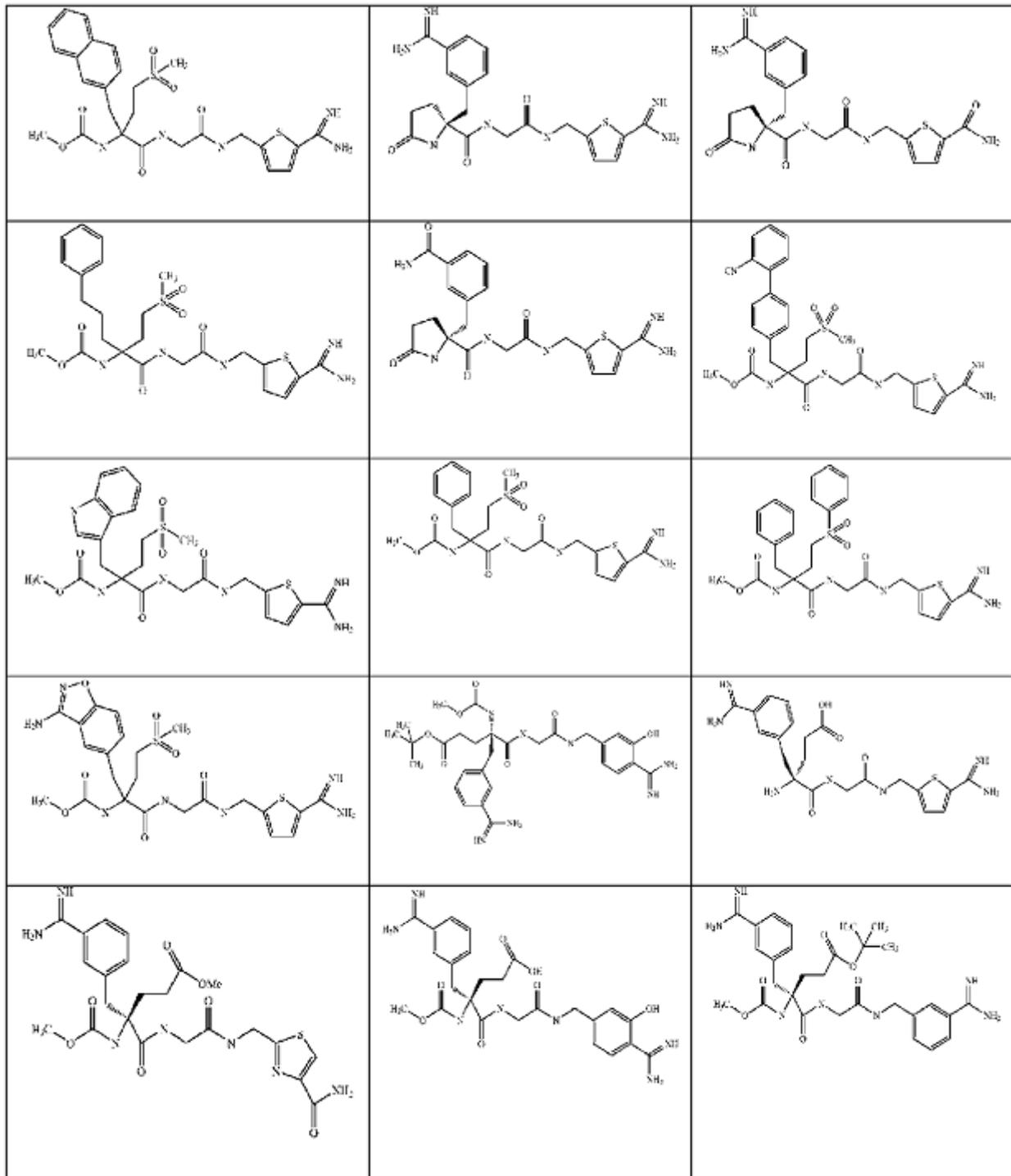
| | |
|--|--|
| | |
| | |
| | |
| <p>4,4'-pentanodiildioxi-bis-benzamidina</p> | <p>1,5-Bis-(4-amidion-fenilmercapto)-pentano</p> |
| <p>4,4'-oxi-bis-benzamidina</p> | |

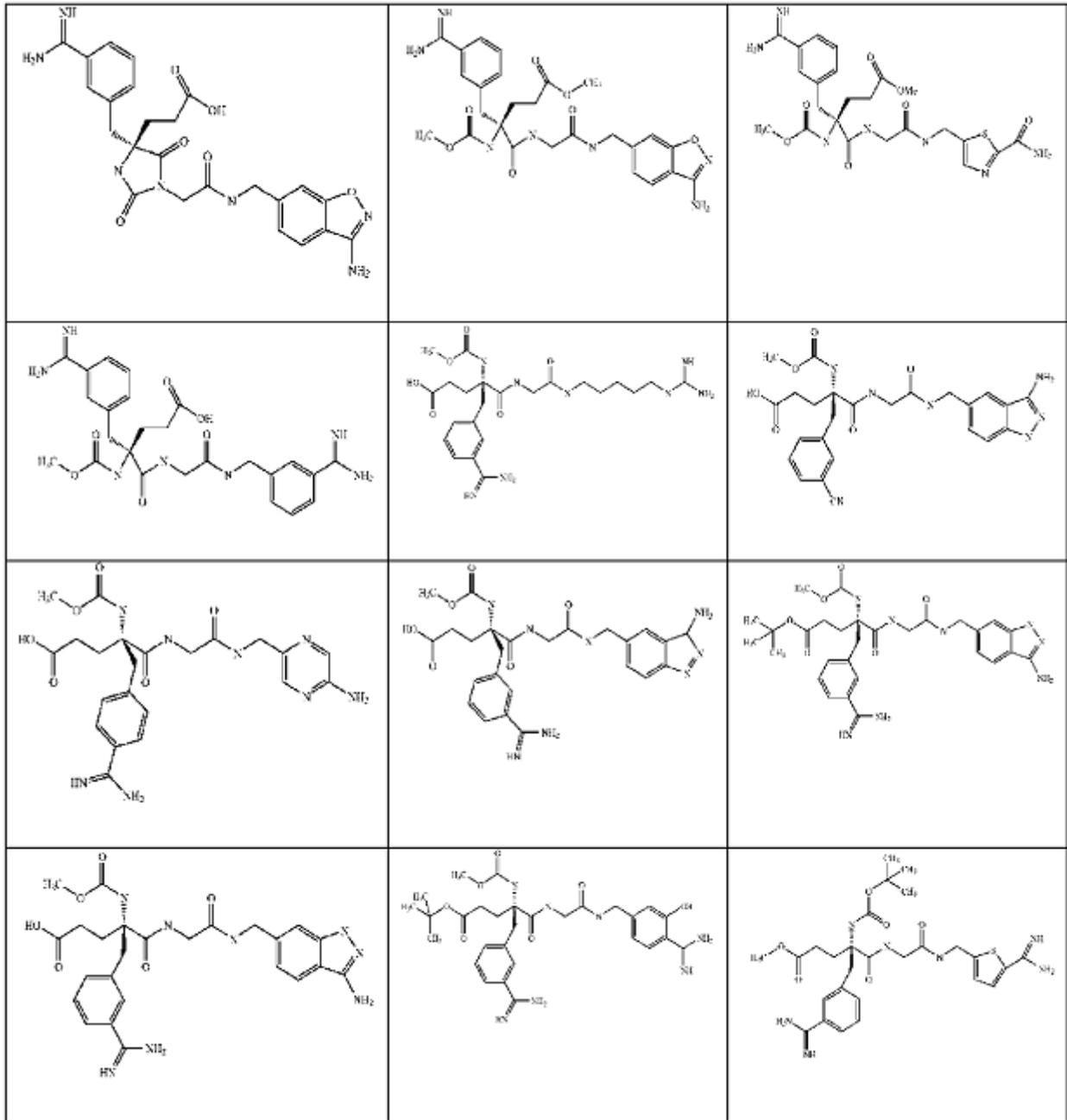
X e Y pueden ser cualquier sustituyente

Tabla 3: Estructuras de inhibidores de matriptasa representativos que se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.019.019





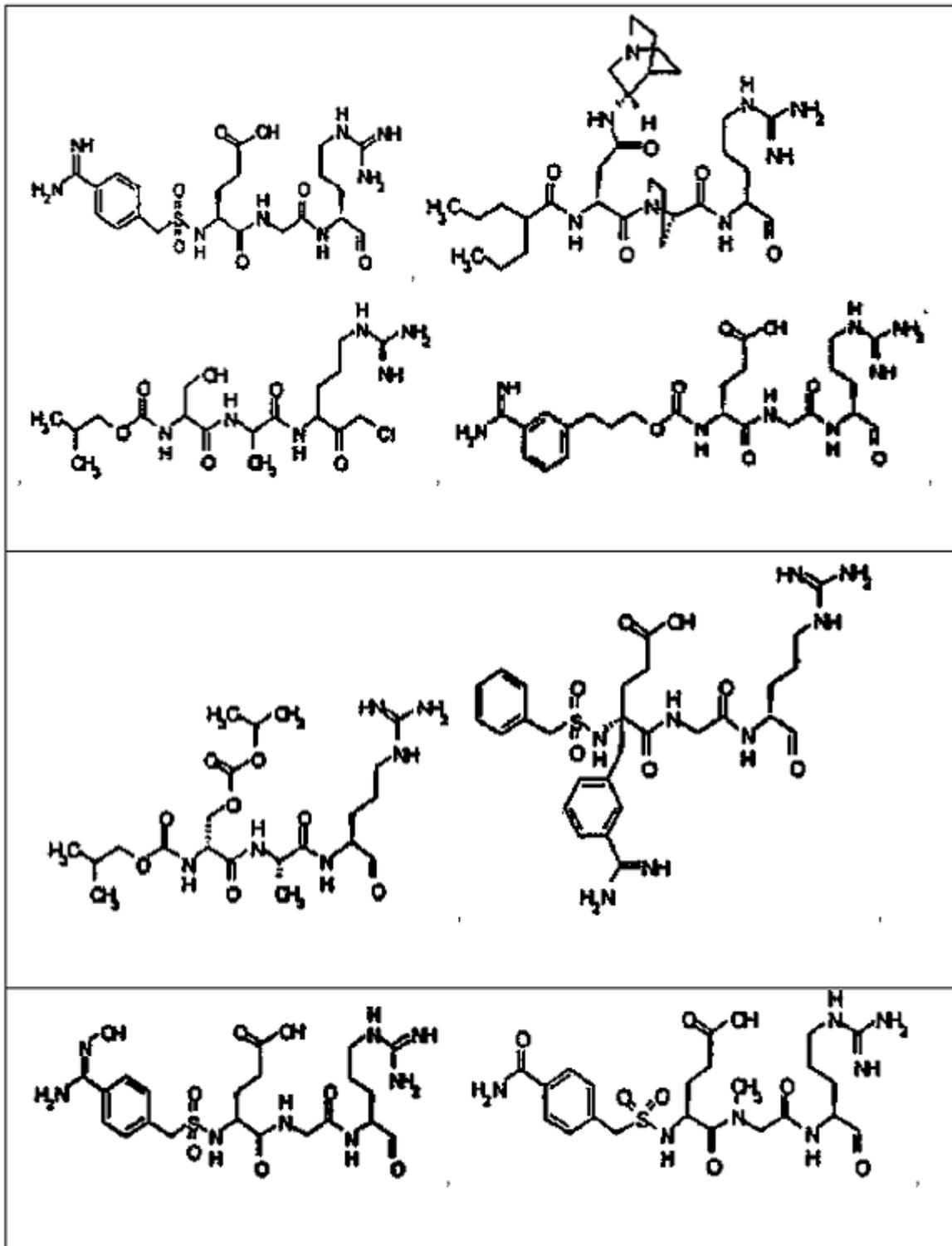


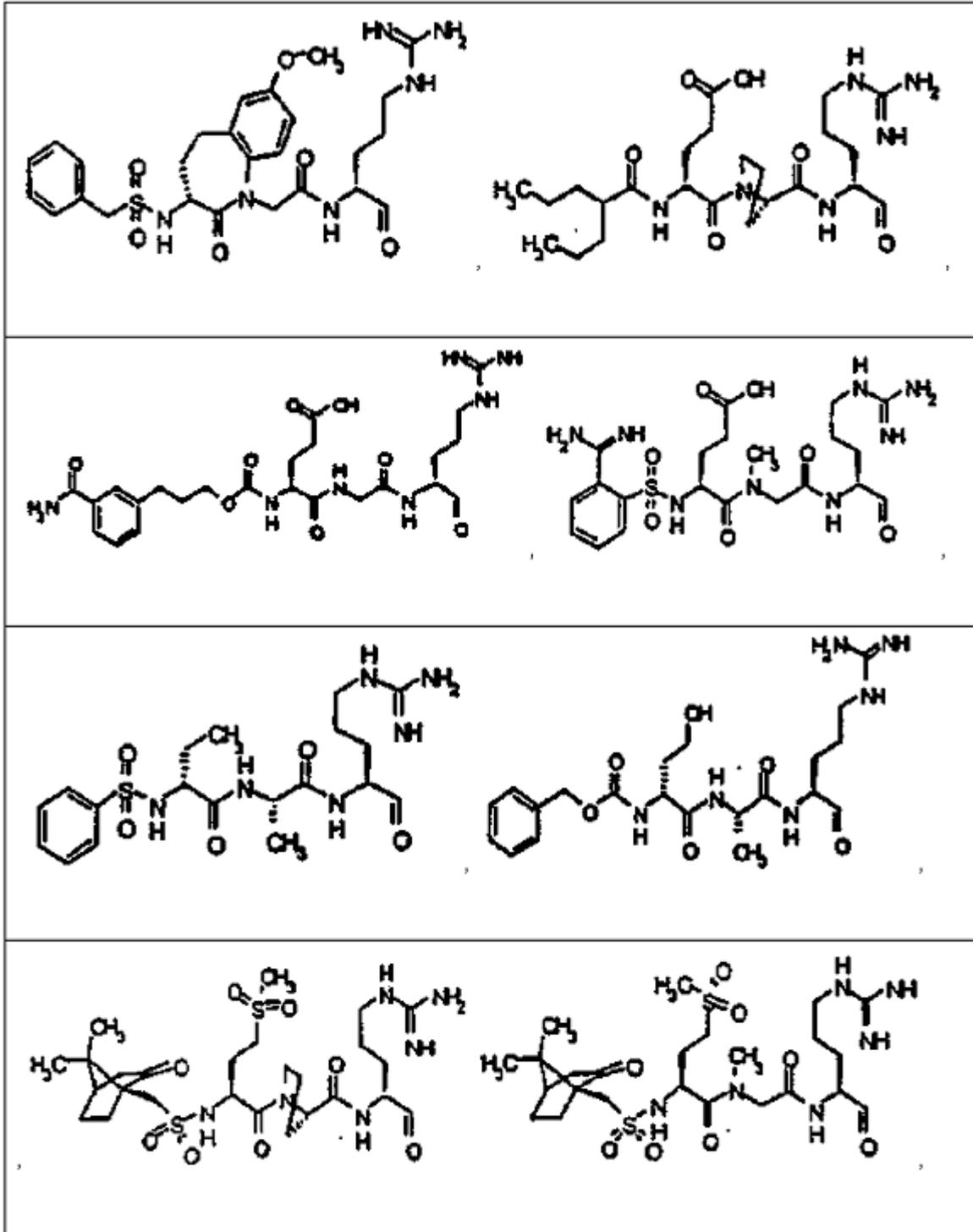


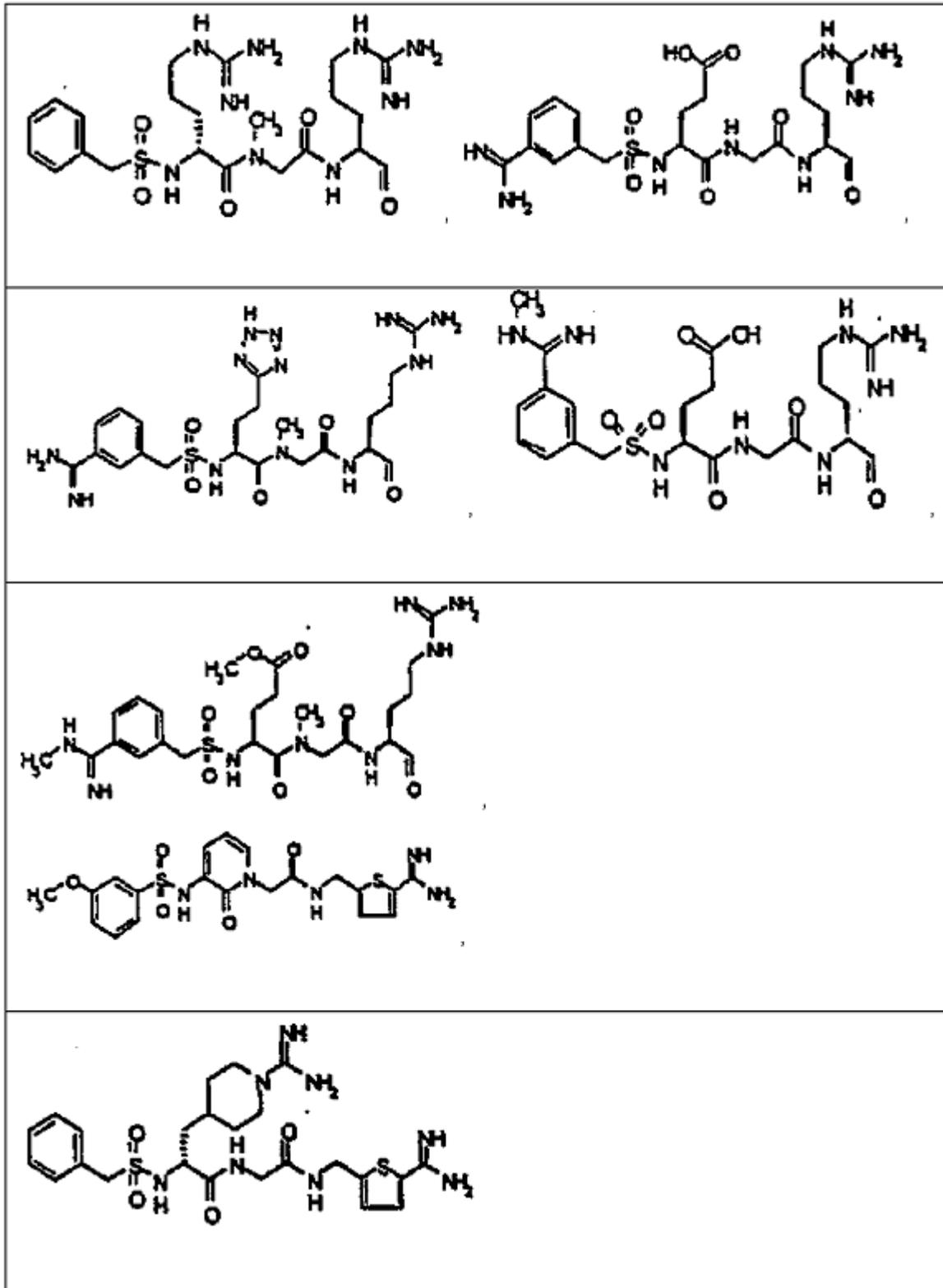
En la publicación de PCT N.º WO 2002/020475 también se desvelan inhibidores de matriptasa. Las estructuras de ejemplos representativos de inhibidores que se desvelan en la misma se representan en la Tabla 4 que sigue a continuación.

5

Tabla 4: Estructuras de inhibidores de matriptasa representativos que se desvelan en el documento WO 2002/020475

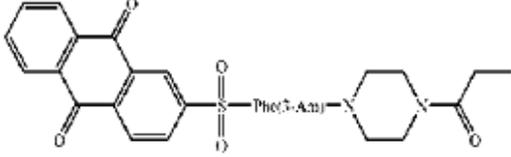
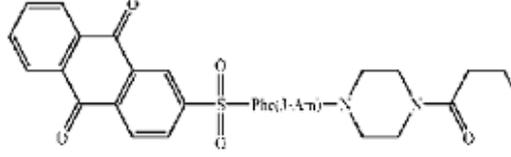
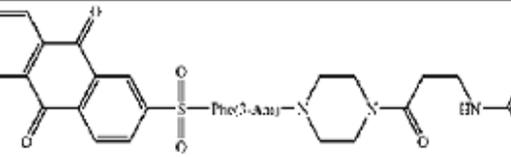
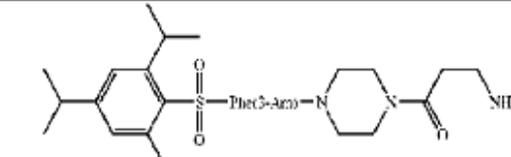
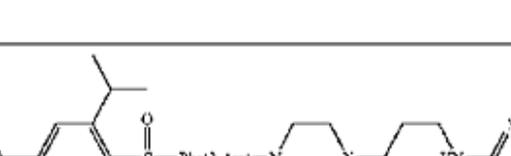
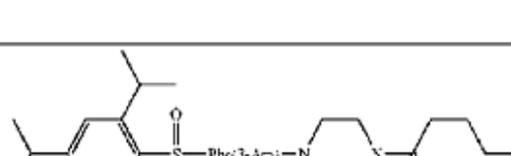
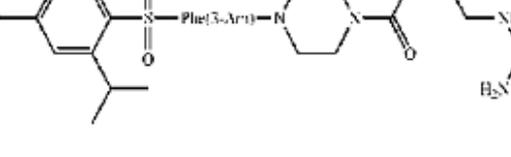
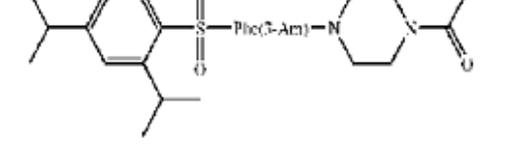
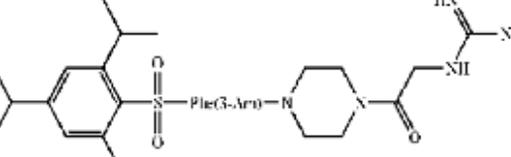
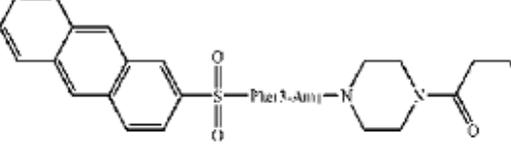
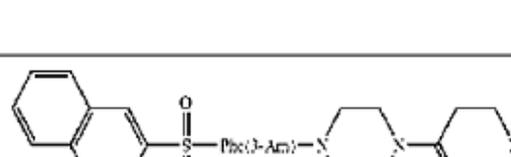


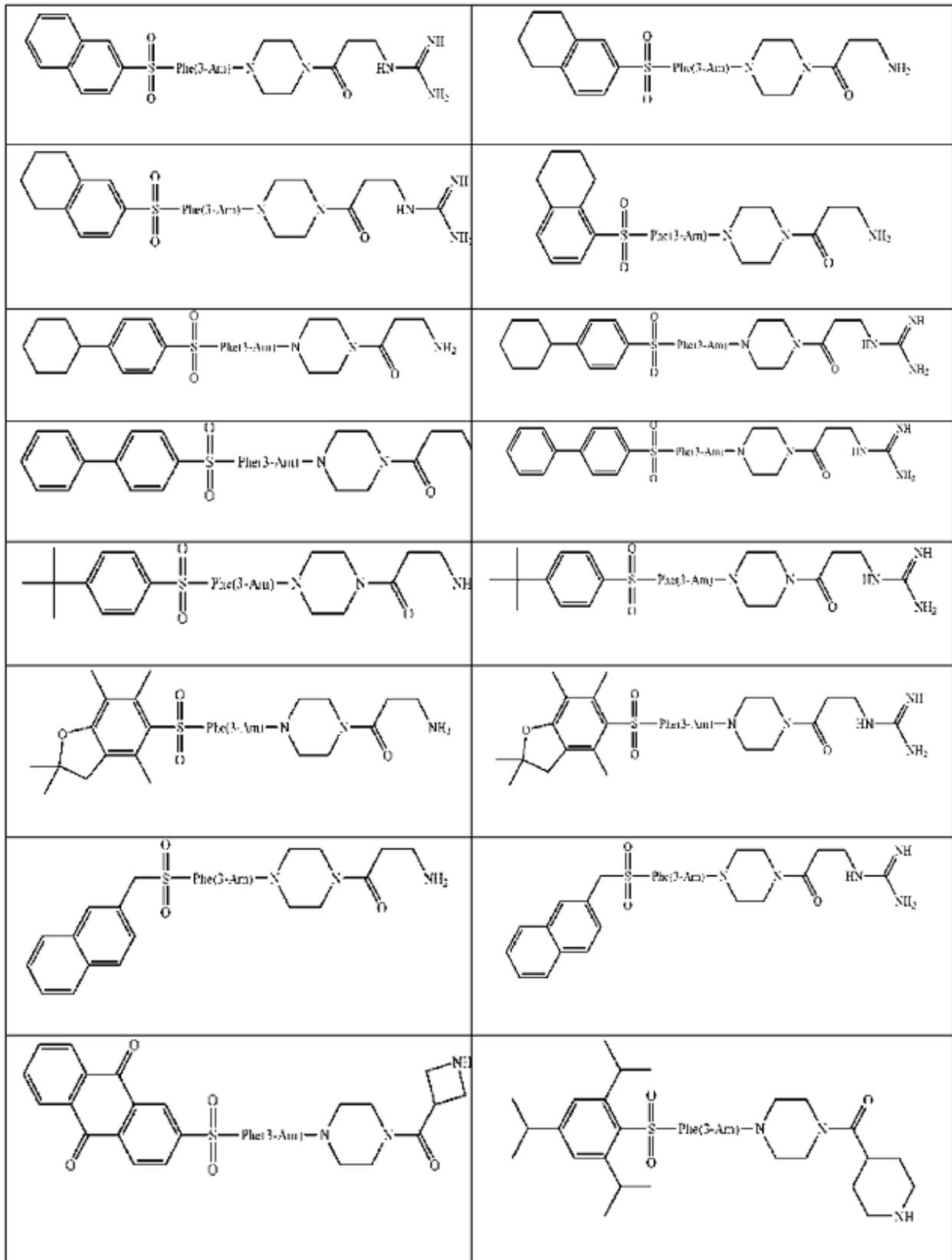


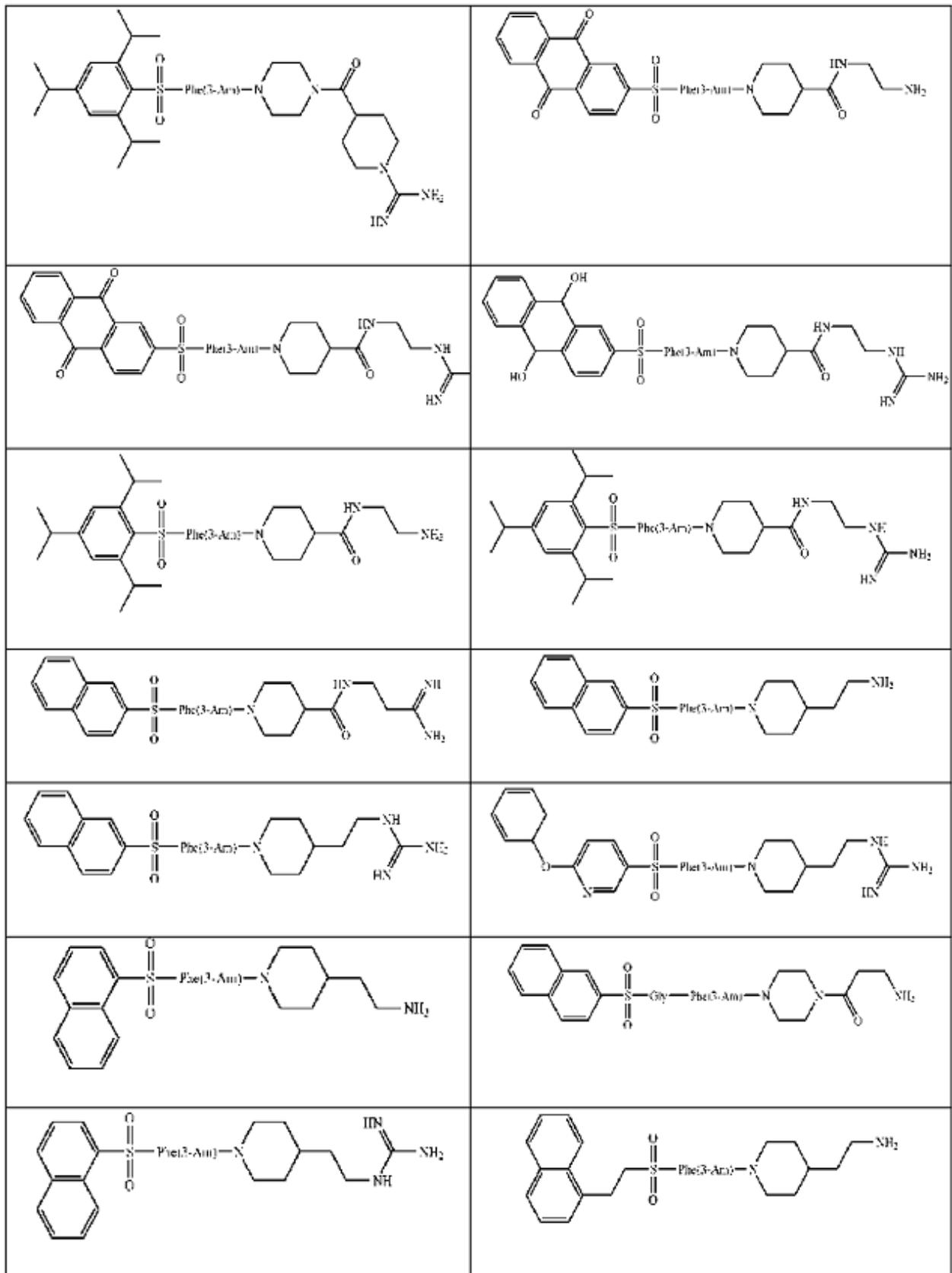


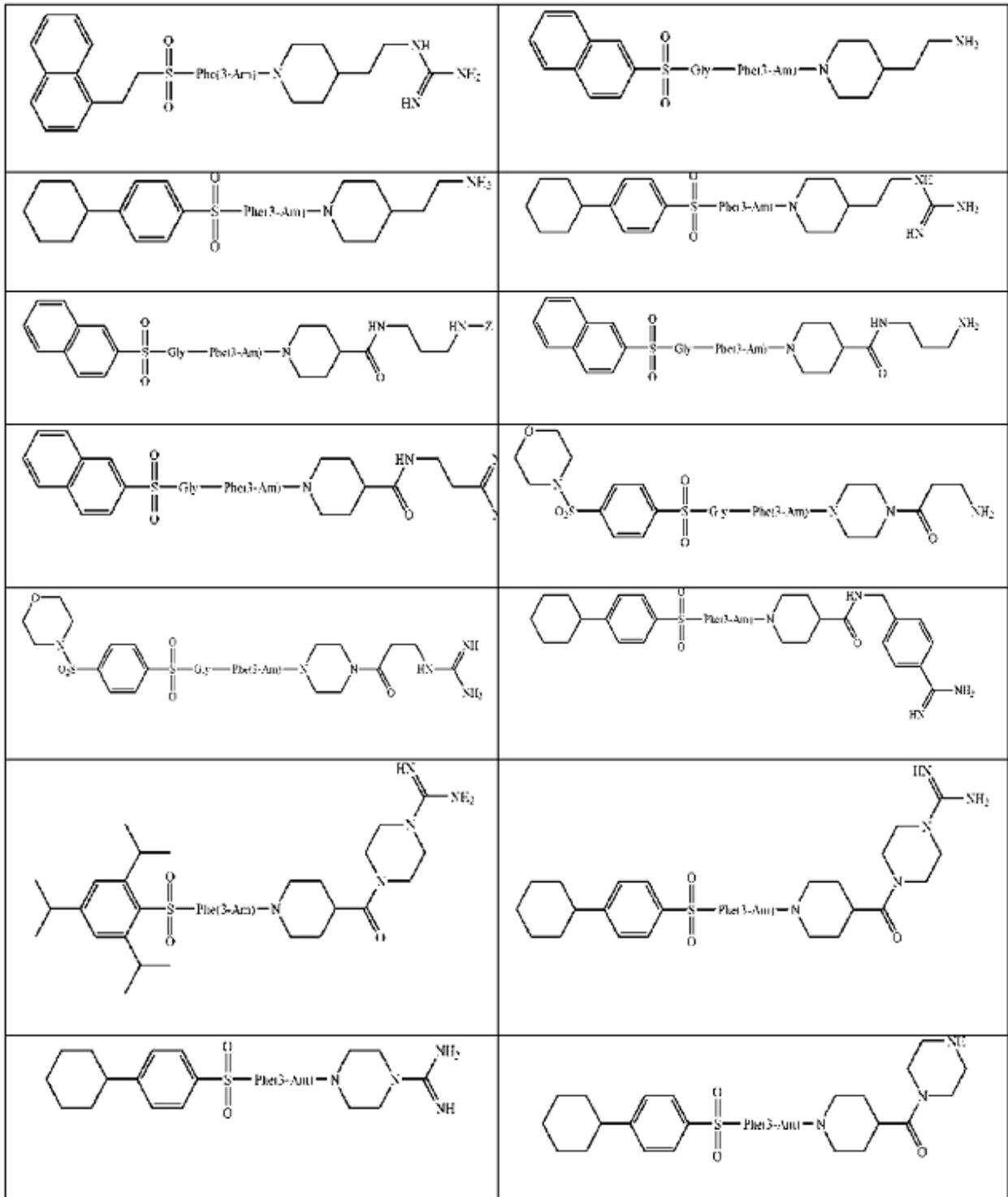
En el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.772.251 también se desvelan inhibidores de matriptasa. Las estructuras de ejemplos representativos de inhibidores que se desvelan en la misma se representan en la Tabla 5 que sigue a continuación.

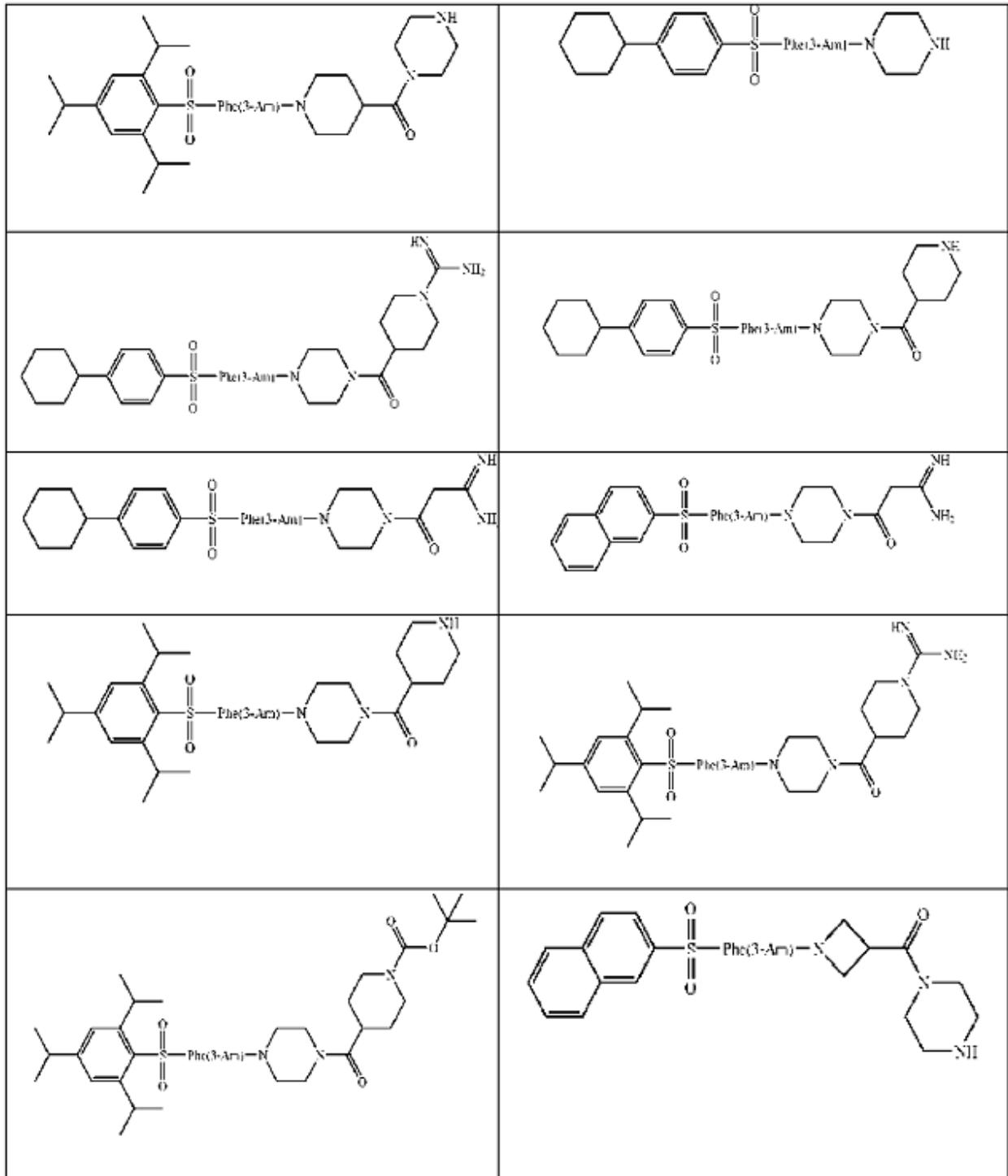
Tabla 5: Estructuras de inhibidores de matriptasa representativos que se desvelan en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.772.251

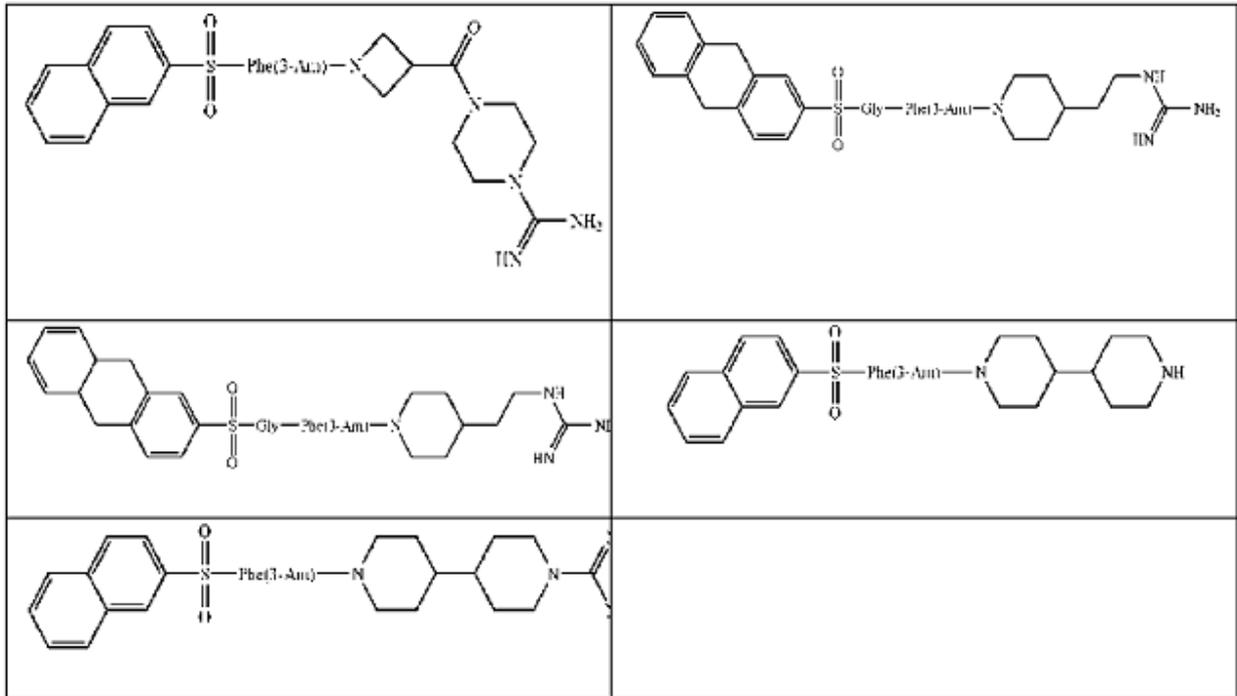
| | |
|---|--|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |







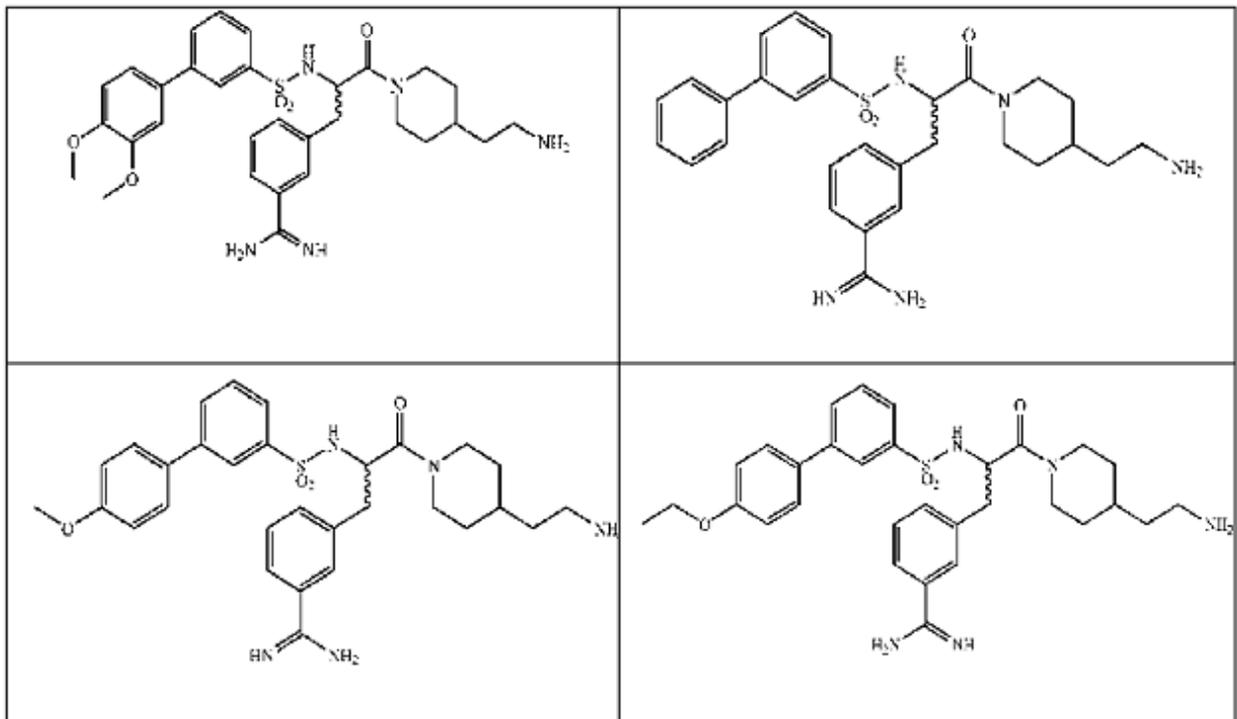


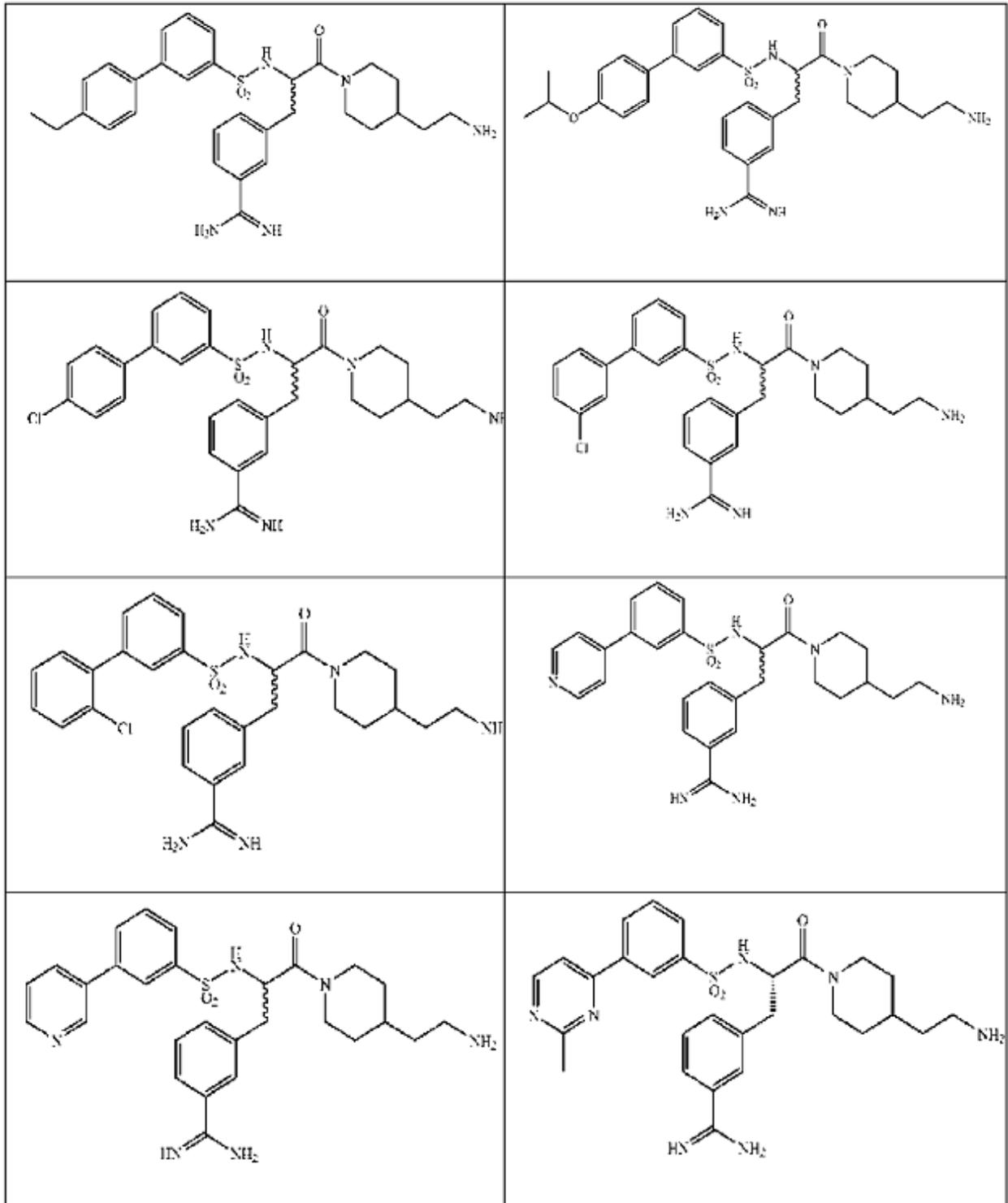


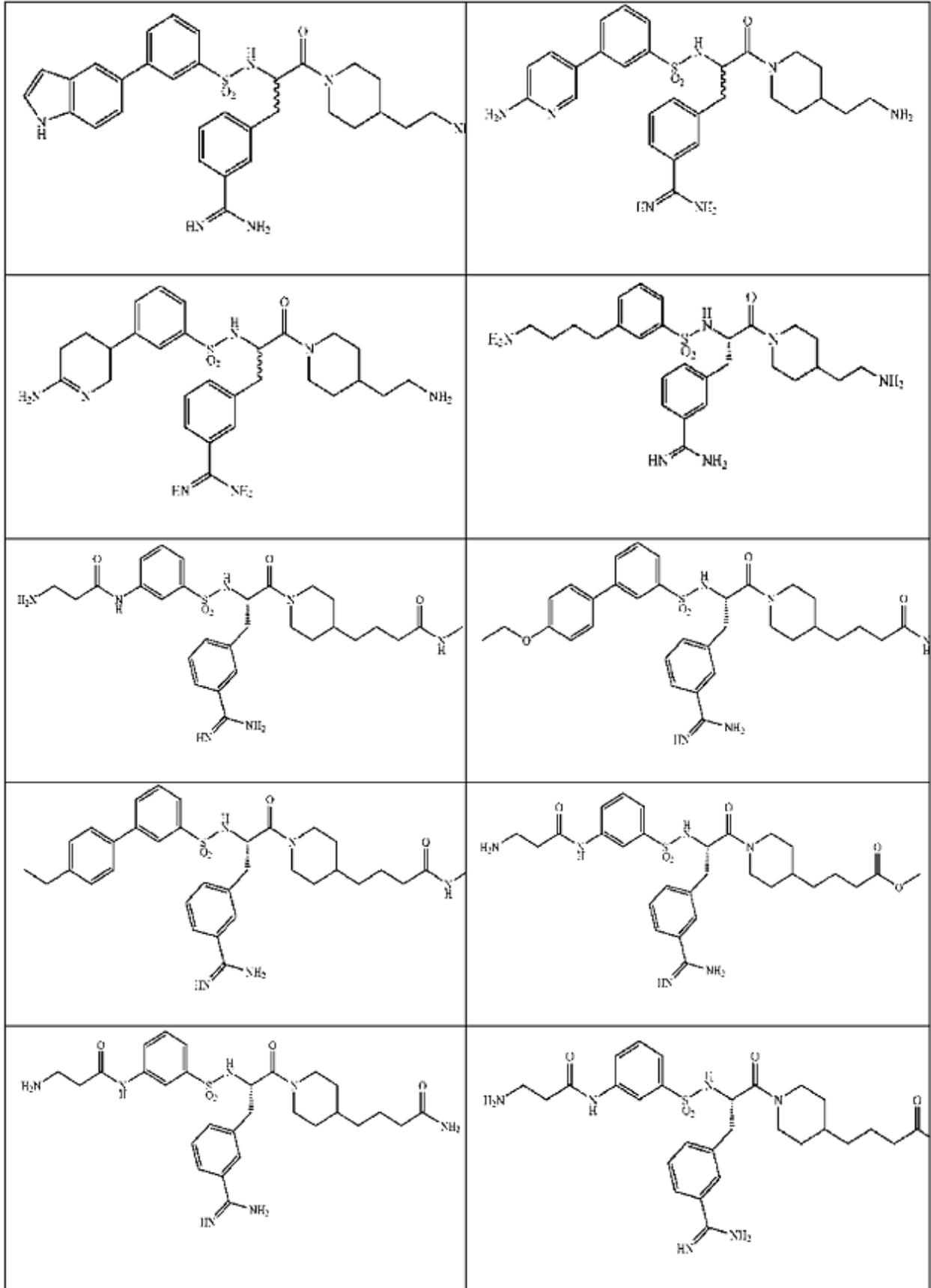
En la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2010/0305090 también se desvelan inhibidores de matriptasa. Las estructuras de ejemplos representativos de inhibidores que se desvelan en la misma se representan en la Tabla 6 que sigue a continuación.

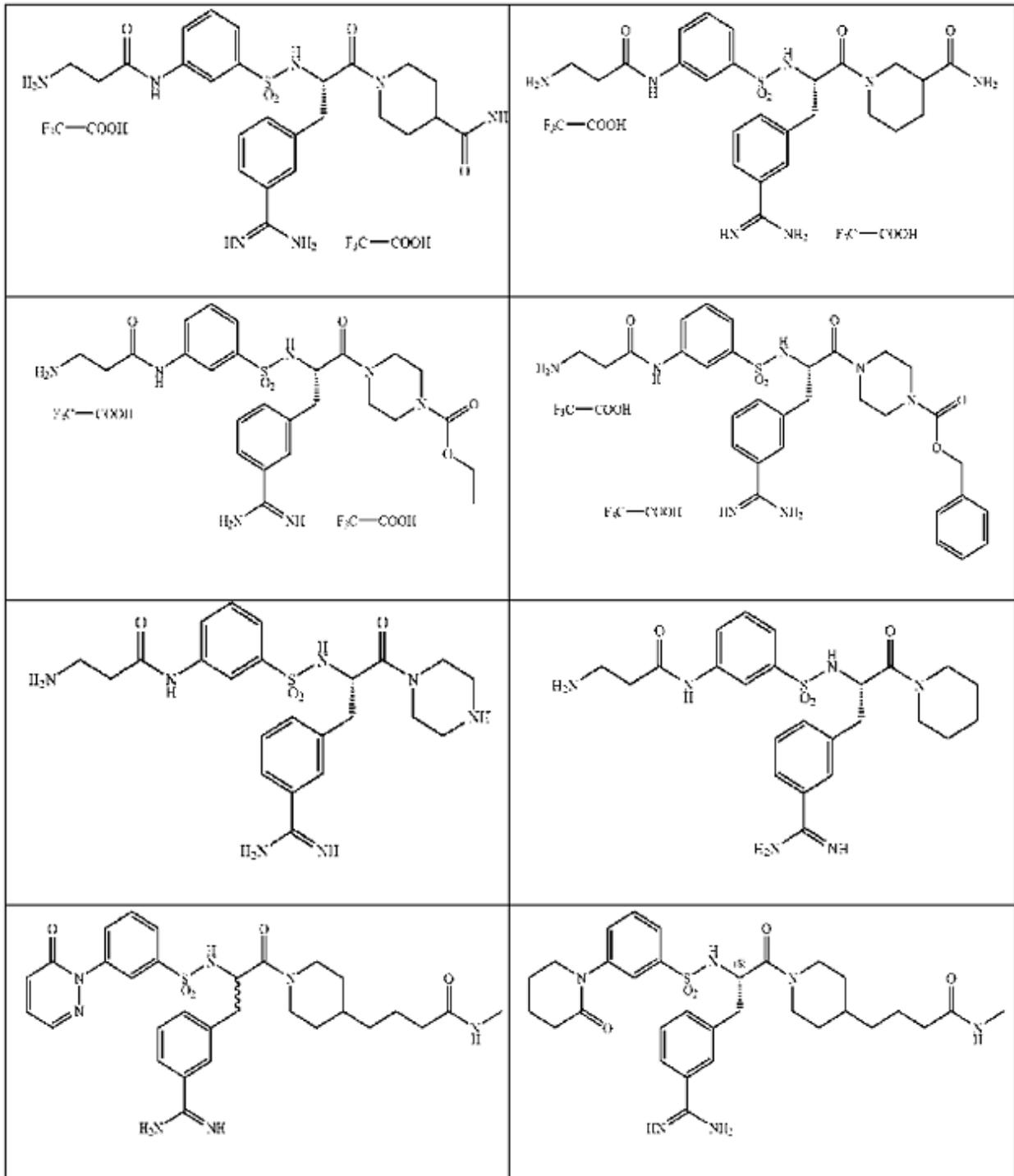
5

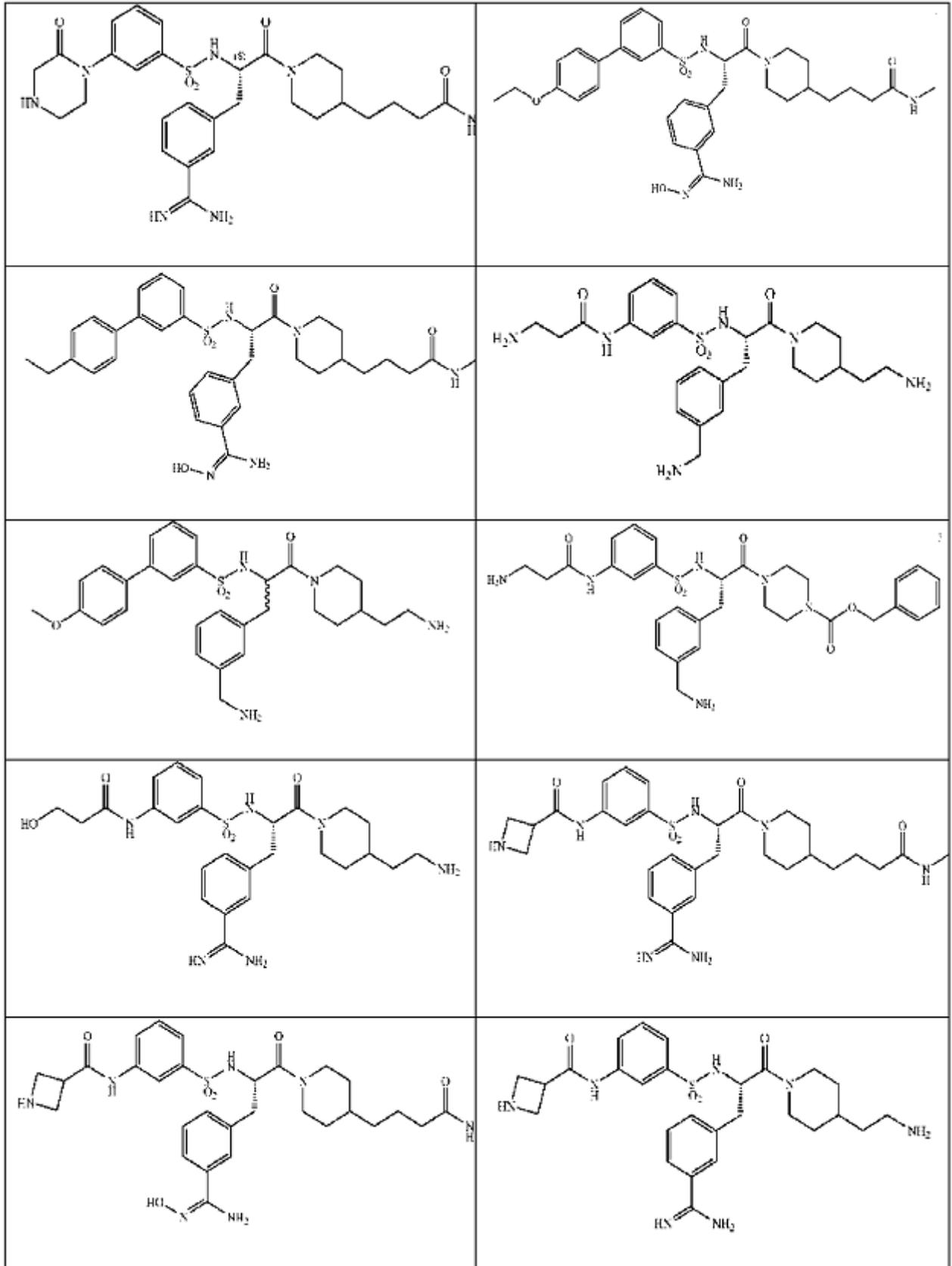
Tabla 6: Estructuras de inhibidores de matriptasa representativos y se desvelan en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2010/0305090

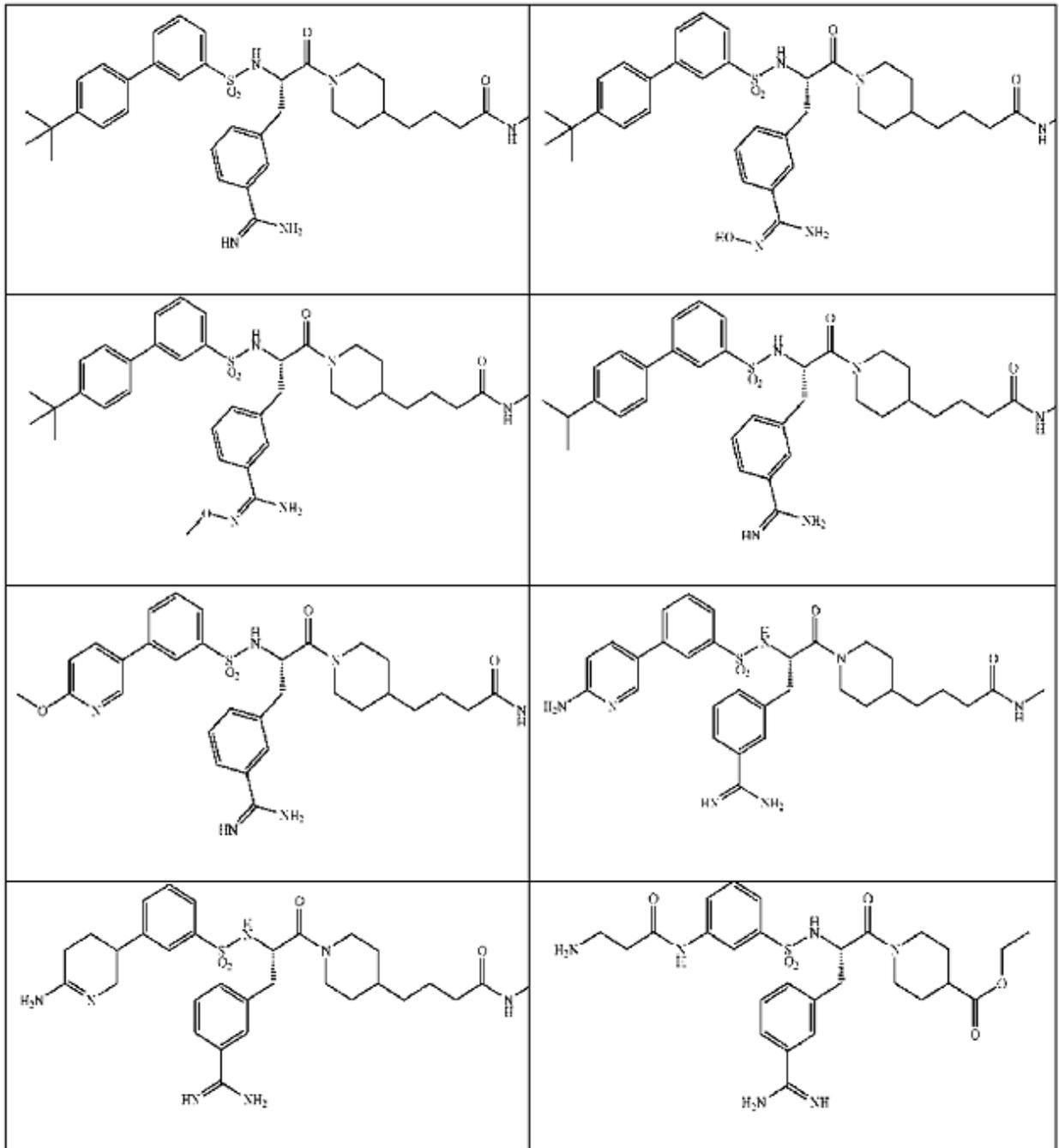


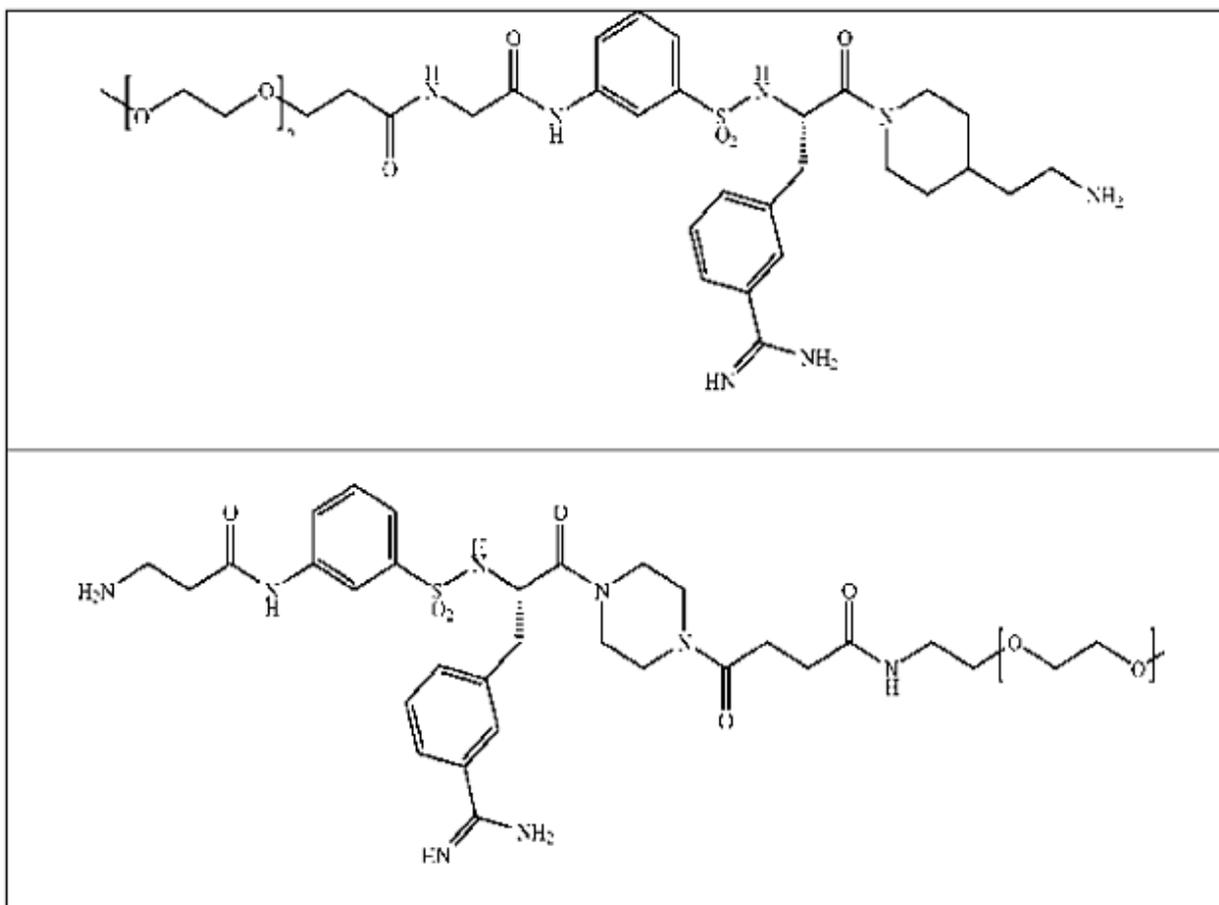












Combinaciones

- 5 Como se usa en el presente documento el término "combinación" cuando se usa en referencia al uso de un inhibidor de matriptasa en combinación con otro agente terapéutico/activo (por ejemplo, antigripal) se refiere a i) de forma simultánea (por ejemplo, en composiciones separadas o una sola composición); ii) de forma simultánea como un compuesto individual de acción doble (por ejemplo, un conjugado de los dos, el inhibidor de matriptasa unido por vía química a otro agente antiviral) en una sola composición; o iii) posteriormente (por ejemplo, en composiciones separadas en las que el inhibidor de matriptasa se administra antes o después del otro agente antiviral). El inhibidor de matriptasa y el agente terapéutico pueden actuar de forma aditiva o, más preferentemente, de formas y enérgica.
- 10 Otros agentes terapéuticos que se pueden usar con inhibidores de matriptasa incluyen, pero no se limitan a, un inhibidor del canal iónico M2 viral o un inhibidor de neuraminidasa. De forma más específica, los agentes de ese tipo pueden ser un ARNsi, Tamiflu™ (oseltamivir), Relenza™ (zanamivir), laninamivir, peramivir, amantadina, rimantadina, ribavirina, vitamina C, Cold Fx™, Equinácea y ginseng.
- 15

La presente invención incluye por lo tanto el uso de una combinación de dos, tres o más principios activos que incluyen un inhibidor de matriptasa. Una combinación de tres compuestos de acuerdo con la presente invención puede incluir un inhibidor de matriptasa (por ejemplo, un compuesto como se ha definido anteriormente), otro agente antigripal y un agente descongestivo.

20

Vías de administración

Los inhibidores de matriptasa se pueden administrar en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en forma de dosificación unitaria. La vía de administración puede depender de una diversidad de factores, tales como el entorno y las dianas terapéuticas, y datos en particular sobre el sujeto. Se puede usar cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, administración por vía nasal, transdérmica (tópica), parenteral, subcutánea, intramuscular, intramamaria, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraarticular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, u oral. Los ejemplos de vías de administración específicas incluyen parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramamaria; oral (por ejemplo, inhalación, con un nebulizador); transdérmica (tópica); transmucosal, Y rectal. Una vía de administración precedente es con un nebulizador o inhalador.

25

30

La práctica farmacéutica convencional se puede usar para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar las composiciones de dicho tipo a pacientes. Los métodos bien conocidos en la técnica Para preparar composiciones farmacéuticas formulaciones se encuentran, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20ª ed.) ed. A. R. Gennaro A R., 2000, Lippincott: Filadelfia.

5

Excipientes/vehículos

Tal como se ha indicado anteriormente, la composición puede comprender adicionalmente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que por lo general no producen una reacción inapropiada alérgica o similar, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administran a animales (por ejemplo, vacas, seres humanos). Preferentemente, como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado por agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que se indica en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

15

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se pueden administrar los compuestos de la presente invención. Como vehículos se pueden usar agua estéril o soluciones salinas acuosas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol, en particular para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.

20

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener por lo tanto excipientes/vehículos farmacéuticamente aceptables no limitantes tales como agentes solubilizantes/diluyentes, antioxidantes, revestimientos entéricos, potenciadores de absorción, agentes para ajuste del pH y tampones, agentes de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes de retraso de la absorción (liberación de tiempo controlado), ajustadores de osmolaridad, agentes isotónicos, agentes conservantes, estabilizantes, tensioactivos, emulsionantes, edulcorantes, agentes espesantes, disolventes, emolientes, agentes colorantes, agentes humectantes, así como colores y sabores y sales para la variación de la presión osmótica. Como se ha mencionado anteriormente, también pueden contener otros agentes terapéuticamente valiosos. En la técnica se conocen bien los métodos para preparar formulaciones apropiadas (véase por ejemplo, Hendrickson, 2005),

25

30

El vehículo/excipiente se selecciona para su administración mediante la vía de administración seleccionada. El uso de medios y agentes de ese tipo para sustancias farmacéuticamente activas se conocerían en la técnica (Rowe *et al.*, Handbook of pharmaceutical excipients, 2003, 4ª edición, Pharmaceutical Press, Londres, Reino Unido). Excepto en la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención.

35

Las formulaciones terapéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; Para administración transmucosal (por ejemplo, rectal, intranasal) o transdérmica/percutánea pueden estar en forma de pomadas, polvos, gotas nasales, pulverizaciones/aerosoles o supositorios; para administración tópica, pueden estar en forma de pomadas, cremas, geles o soluciones; para administración parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intradérmica, por vía intramamaria, por vía subcutánea, por vía intratecal o por vía transdérmica), usando por ejemplo soluciones inyectables. Además, la administración se puede realizar por vía sublingual o como preparaciones oftalmológicas o como un aerosol, por ejemplo en forma de una pulverización. Una forma de uso preferente es la administración intravenosa, intramuscular u oral.

40

45

Oral

Para el fin de administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se puede usar por ejemplo en forma de comprimidos, trociscos, grageas, cápsulas de gelatina duras y blandas, soluciones (por ejemplo, jarabes), aerosoles, emulsiones o suspensiones, o cápsulas. Para la preparación de formulaciones para administración oral, los compuestos de la presente invención se pueden mezclar con excipientes inorgánicos u orgánicos, farmacéuticamente inertes (por ejemplo, agentes de unión y/o adyuvante farmacéuticamente compatibles). Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los ingredientes, o compuestos siguientes de una naturaleza similar: una aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; una sustancia de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizantes tal como menta, salicilato de metilo, o sabor a naranja. Los ejemplos de excipientes adecuados para comprimidos, grageas o cápsulas de gelatina dura por ejemplo incluyen lactosa, almidón de maíz o derivados de los mismos, talco o ácido esteárico o sales de los mismos. Los excipientes adecuados para uso con Cápsulas de gelatina blanda incluyen por ejemplo aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos, etc.; sin embargo, de acuerdo con la naturaleza de los principios activos se puede producir el caso de que no sea necesario un excipiente para las cápsulas de gelatina blanda.

60

65

Para la preparación de soluciones y jarabes, los excipientes que se pueden usar incluyen por ejemplo agua, polioles, sacarosa, azúcar invertido y glucosa.

Nasal/Inhalación

5 Un compuesto y/o composición inhibitorios de la invención también se puede administrar directamente al pulmón mediante inhalación. Para administración mediante inhalación, un compuesto y/o composición de la invención se puede administrar de forma conveniente al pulmón mediante un número de diferentes dispositivos. Por ejemplo, un Inhalador de Dosis Medida ("MDI"), que utiliza latas que contienen un agente propulsor de bajo punto de ebullición, (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono o Cualquier otro gas adecuado) se puede usar para administrar compuestos de la invención directamente al pulmón. Una pulverización de aerosol a partir de un recipiente o dispensador presurizado que contiene un agente propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un unificador.

15 Como alternativa, un dispositivo Inhalador de Polvo Seco ("DPI") se puede usar para administrar un compuesto y/o composición de la invención al pulmón. Los dispositivos de DPI por lo general usan un mecanismo tal como un estallido de gas para crear una nube de polvo seco dentro de un recipiente, que a continuación lo puede inhalar el paciente. Los dispositivos de DPI también se conocen bien en la técnica. Una variación popular es el sistema de DPI de múltiples dosis ("MDDPI"), que permite la administración de más de una dosis terapéutica. Por ejemplo, se pueden formular cápsulas y cartuchos de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla de polvo de un compuesto de la invención y una base de polvo adecuado tal como lactosa o almidón para estos sistemas.

25 Otro tipo de dispositivo que se puede usar para administrar un compuesto y/o composición de la invención al pulmón es un dispositivo de pulverización de líquido. Los sistemas de pulverización de líquido usan agujeros de boquilla extremadamente pequeños para aerosolizar formulaciones de fármaco líquido que a continuación se pueden inhalar directamente en el pulmón.

30 En una realización, un nebulizador se usa para administrar un compuesto y/o composición de la invención al pulmón. Los nebulizadores crean aerosoles a partir de formulaciones de fármaco líquido mediante el uso, por ejemplo, de energía ultrasónicas para formar partículas finas que se pueden inhala fácilmente. Los ejemplos de nebulizadores incluyen dispositivos proporcionados por Sheffield/Systemic Pulmonary Delivery Ltd. (véase, Armer *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.954.047; van der Linden *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.950.619; van der Linden *et al.*, U documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.970.974), Aventis, y Batelle Pulmonary Therapeutics.

35 En otra realización, un dispositivo de aerosol electrohidrodinámico ("EHD") se usa para administrar un compuesto y/o composición de la invención al pulmón. Los dispositivos de aerosol de EHD usan energía eléctrica para aerosolizar soluciones o suspensiones de fármaco líquido (véase por ejemplo, Noakes *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.765.539). Los dispositivos de aerosol de Elm pueden administrar fármacos al pulmón de forma más eficaz y otras tecnologías de administración pulmonar.

40 Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o pueden ser soluciones oleosas para su administración en forma de gotas nasales, o como un gel.

Transmucosal o transdérmica (tópica)

45 Para administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera a atravesar. Los agentes penetrantes de ese tipo se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede realizar a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, o cremas como se sabe generalmente en la técnica. Para supositorios, y aplicación local o percutánea, los excipientes que se pueden usar incluyen por ejemplo aceites naturales o endurecidos, ceras, grasas y polioles semisólidos o líquidos.

Parenteral

60 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (que son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión inyectables estériles. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección (que son solubles en agua), solución salina, aceites no volátiles (por ejemplo, aceite de parafina), polialquilen glicoles tales como polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, aceites de origen vegetal, o naftalenos hidrogenados; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiamintetraacético; agentes reductores tales como ditiotreitrol,

tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Para controlar la liberación de los compuestos se pueden usar polímero de lactida biodegradable, biocompatible, copolímero de lactida/glicólido, o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para compuestos de la invención incluyen partículas de copolímero de acetato etileno y vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. La preparación parenteral también se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados con vidrio o plástico.

Para administración intravenosa o intramamaria, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a tipos de células específicas) también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Se ha descrito una diversidad de formulaciones liposomales adecuadas para administración de un compuesto a un animal y se ha demostrado que son eficaces para la administración de una diversidad de compuestos, incluyendo, por ejemplo, moléculas pequeñas, ácidos nucleicos, y polipéptidos.

Como se ha mencionado anteriormente, los medicamentos que contienen los compuestos de la presente también son un objeto de la presente invención, ya que es un proceso para la fabricación de los medicamentos de ese tipo, proceso que comprende poner uno o más de los compuestos de la presente invención, si se desea, con una o más sustancias terapéuticamente valiosas en una forma de administración galénica.

Kits

La presente invención también incluye kits que comprenden los compuestos de la presente invención. Por ejemplo, el kit puede comprender uno o más compuestos inhiben el virus de la gripe. El kit puede incluir opcionalmente una o más muestras de control y un dispositivo (por ejemplo, inhalador, nebulizador, etc.). Los compuestos o agentes se pueden envasar en un recipiente adecuado. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para el uso del kit.

Aplicaciones de los compuestos y composiciones

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar/que trata/tratamiento" y "prevenir/que previene/prevención", se refieren a provocar la respuesta biológica deseada, es decir, un efecto terapéutico y profiláctico, respectivamente. De acuerdo con la invención objeto, el efecto terapéutico comprende una disminución/reducción de la evolución de la infección o en la gravedad de los síntomas asociados o una cura completa de la infección y/o síntomas asociados. De acuerdo con la invención, un efecto profiláctico puede comprender un retraso o disminución del inicio de, progresión de, o la gravedad de la infección por gripe y síntomas asociados (por ejemplo, título viral en la sangre del sujeto, células o frotis nasofaríngeos, moqueo nasal, nariz taponada, estornudos, dolor de garganta, garganta irritada, tos, ronquera, congestión de cabeza, congestión en el pecho, sensación de cansancio, fiebre, dolor muscular, pérdida de apetito, dolor de cabeza y escalofríos), después de la administración de un inhibidor de la presente invención. En una realización, la composición de la presente invención, que comprende un inhibidor de fórmula (1), (1.1), (1.2), (2.1) o (3), evita que el sujeto contraiga una infección por ortomixovirus. Los métodos, composiciones, formulaciones y usos que se describen en el presente documento son adecuados tanto para seres humanos como para animales (incluyendo aves), preferentemente mamíferos.

Como se usa en el presente documento, el término "gripe" e "infección por gripe" se refiere a una enfermedad infecciosa causada por ciertos virus de ARN de la familia de ortomixovirus (por ejemplo, virus de la gripe). Incluye infecciones de por virus de las gripes A, B y C. Afecta a aves y mamíferos. Los síntomas más comunes de la enfermedad son escalofríos, fiebre, dolor de garganta, garganta irritada, dolores musculares, dolor de cabeza, congestión en el pecho, congestión de cabeza, tos, debilidad, agotamiento, pérdida de apetito y malestar general.

Se sabe que la matriptasa se expresa en una diversidad de cánceres, en particular tumores humanos derivados de los epitelios tales como carcinomas de próstata, mama, colon, estómago, ovario, renal y cuello uterino (Revisados en Lee, *J. Cancer Mol.* **2** (5): 183-190, 2006). Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la inhibición del crecimiento, progresión y/o metástasis tumoral en un sujeto con necesidad del mismo, método que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz del inhibidor de fórmula (1), (1.1), (1.2), (2.1) o (3) definido anteriormente. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del inhibidor de fórmula (1), (1.1), (1.2), (2.1) o (3) definido anteriormente para la inhibición del crecimiento, progresión y/o metástasis tumoral en un sujeto. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso del inhibidor de fórmula (1), (1.1), (1.2), (2.1) o (3) definido anteriormente para la preparación de un medicamento para la inhibición del crecimiento, progresión y/o metástasis tumoral en un sujeto.

Dosificaciones

Las composiciones y formulaciones de la presente invención se administran en cantidades y a una frecuencia suficiente como para prevenir o tratar infecciones por gripe y/o mejorar cualquier síntoma asociado con la gripe. El experto en la materia observará que determinados factores pueden influir en la dosificación necesaria para tratar de forma eficaz a un sujeto, que incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general, peso y/o edad del sujeto, las necesidades del paciente y el modo de aplicación, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención puede incluir una serie de tratamientos.

Cualquier cantidad de una composición de la presente invención se puede administrar a un sujeto, con la condición de que no esté asociada con efectos adversos importantes y que se encuentre en una dosis no tóxica. Por lo general, la cantidad de inhibidor contenido dentro de una dosis individual será una cantidad que evite o trate de forma eficaz una infección por ortomixovirus (por ejemplo, gripe) y uno o más síntomas asociados, sin inducir una toxicidad significativa, es decir, la composición mejora o reduce uno o más de: título viral en la sangre o células del sujeto, moqueo nasal, nariz taponada, estornudos, dolor de garganta, garganta irritada, tos, ronquera, congestión de cabeza, congestión en el pecho, debilidad general, fiebre, dolor muscular, pérdida de apetito, dolor de cabeza y escalofríos. Generalmente, la dosis eficaz no superará la farmacopea de CA, US y EP para cada producto de forma individual.

Por lo tanto, en un aspecto de la presente invención, la composición que comprende los inhibidores de la presente invención, y/o uno u otros inhibidores más de matriptasa, se administra antes del inicio de los síntomas de la gripe como una medida preventiva. En otro aspecto de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención se administra en combinación con un fármaco o fármacos usados para tratar los síntomas de la gripe. En un aspecto adicional, la composición de la presente invención se administra una vez que el sujeto ha sido diagnosticado con infección por gripe o después del inicio de los síntomas de la gripe. En otra realización, la composición de la presente invención se administra en combinación con uno u otros fármacos más usados para la prevención y/o tratamiento de infecciones por gripe tales como Tamiflu™ (oseltamivir), Relenza™ (zanamivir), laninamivir, peramivir, amantadina, rimantadina, ribavirina, vitamina C, vitamina C, Cold Fx™, equinácea, ginseng, etc.

Como se usa en el presente documento la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende hacer referencia a una cantidad eficaz para conseguir el efecto terapéutico deseado a la vez que se evitan efectos secundarios adversos, tales como una mejora de la afección del paciente. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más dosis. Para los fines de la presente invención, una cantidad eficaz en la composición de la presente invención es una cantidad que induce una respuesta terapéutica o profiláctica contra infecciones por la gripe. una cantidad de ese tipo puede variar de acuerdo con la naturaleza de la infección (tipo específico de infección viral), la gravedad de la infección con el modo de administración, la edad, peso y sexo del sujeto afectado, etc. Un experto en la materia puede determinar fácilmente y casi sin dificultad cuál será esa cantidad eficaz. Generalmente, la cantidad eficaz estará entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 5000 mg, preferentemente entre 5 y 500 mg de inhibidor de la presente invención. En una realización, la cantidad eficaz está entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 400 mg de inhibidor. En otra realización, la composición mencionada anteriormente comprende entre aproximadamente 5 mg y aproximadamente 300 mg de inhibidor.

La cantidad eficaz se puede administrar diariamente en una o varias dosis (por ejemplo, dos veces al día, tres veces al día o 4 veces al día). También se puede administrar cada 2 días, cada 3 días o una vez a la semana, tal como se prescriba. Preferentemente, la cantidad eficaz se administra una vez al día.

La cantidad eficaz a administrar a un sujeto humano se calcula a partir de estudios en animales. La dosis eficaz se puede aumentar hasta una dosis equivalente humano (HED) para ensayos clínicos de partida usando tablas de conversión publicadas que proporcionan un factor de conversión de ratones a seres humanos de 12,3.

Estas son simplemente directrices ya que la dosis real se puede seleccionar y valorar con cuidado por el médico que prescribe basándose en factores clínicos únicos para cada paciente. La dosis diaria óptima se determinará con métodos conocidos en la técnica y estará influida por factores tales como la edad del paciente tal como se indicaba anteriormente y otros factores clínicamente relevantes.

Toxicidad y eficacia terapéutica

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos de ese tipo se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para la determinación de la DL₅₀ (la dosis letal para un 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50 % de la población). La proporción de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción DL₅₀/DE₅₀. Los compuestos que presentan índices terapéuticos grandes son preferentes. Aunque se pueden usar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debería tener cuidado en el diseño de un sistema de administración que dirija tales compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar

el daño potencial a células sin infectar y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios con animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de los concursos de ese tipo Permanece preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación usada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición senil máxima de los síntomas) tal como se determina en cultivo celular. Tal información se puede usar para determinar de forma más precisa las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en tándem con espectrometría de masas.

15 **Dianas Virales**

Los compuestos de la presente invención se pueden usar como agentes antivirales. En este sentido, los compuestos de la presente invención se usan contra virus que requieren escisión proteolítica de HA para su activación. En una realización específica, las dianas virales de la presente invención son virus de la familia de ortomixovirus tales como gripe (por ejemplo, de tipo A, B o C).

Sujetos

El término "sujeto" en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier mamífero incluyendo un ratón, rata, gato, perro, vaca, cerdo, mono, un ave y un caballo. En una realización específica, se refiere a un ser humano. Un "sujeto con necesidad del mismo" o un "paciente" en el contexto de la presente invención pretenden incluir cualquier sujeto que se beneficiará o que será probable que se beneficie del inhibidor de la presente invención. En una realización, un sujeto con necesidad del mismo es un sujeto diagnosticado con una infección por ortomixovirus (por ejemplo, gripe). En otra realización, un sujeto con necesidad del mismo es un sujeto que es probable que contrae una infección por ortomixovirus (por ejemplo, gripe) o en el que es probable que una infección por ortomixovirus (por ejemplo, gripe) tenga consecuencias de salud importantes (por ejemplo, niños jóvenes, personas de edad avanzada o sujetos inmunodeficiencias). La probabilidad de contraer una infección por ortomixovirus (por ejemplo, gripe) se puede determinar por ejemplo con la prevalencia de la enfermedad en el entorno del sujeto incluyendo los miembros cercanos de la familia (hermanas, hermanos, padres, abuelos, tíos y tías, esposa, colegas, amigos, etc.). En una realización, un sujeto con necesidad del mismo es un sujeto que padece la infección por ortomixovirus (por ejemplo, gripe) o cualquier síntoma asociado.

La presente invención se ilustra con detalles adicionales mediante los siguientes ejemplos más limitantes.

40 **Ejemplo 1**

EXPRESIÓN DE MATRIPTASA EN CÉLULAS EPITELIALES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS HUMANAS

Los extractos de ARN de diversas líneas de células del sistema respiratorio humano incluyendo Calu-3, H292, A549 y Beas-2B, de pulmones humanos normales (Ambion) se obtuvieron usando el método de extracción Trizol™ Para sondear la expresión de ARNm de matriptasa. El ADNc se obtuvo después de transcripción inversa de ARN usando cebadores aleatorios. A continuación, los cebadores específicos para matriptasa (FW-ctaggatgagcagctgtgga (SEQ ID NO: 3); RV-aagaattgaagcgcacctt (SEQ ID NO: 4)) se usaron para amplificar por PCR cualquier mensaje de ARN para la proteasa. Se usó agua en lugar de ARN como control negativo (-) y un plásmido que contenía la secuencia de matriptasa (que codifica los restos 1-855 de SEQ ID NO: 2) se usó como un control positivo (+). Los resultados mostraron que el ARNm para la matriptasa estaba presente en células Calu-3, H292 y Beas-2B así como en células de pulmón humano normal (Figura 2). Estos resultados mostraron en las células del sistema respiratorio humano pueden producir el ARN mensajero para la serina-proteasa de matriptasa, sugiriendo de ese modo que estas células pueden expresar la enzima en forma de proteína.

A continuación se determinó, mediante transferencia de Western, si la proteína matriptasa era expresada por células respiratorias humanas. Los extractos de proteína se obtuvieron a partir de cada línea celular (Calu-3, H292, A549, Beas-2B, NHBE y 16-HBE) y se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Después de SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon usando leche seca sin grasa en Solución Salina Tamponada con Tris (TBS) con Tween™ 20. A continuación las membranas se marcaron con un anticuerpo específico de matriptasa/ST14 de conejo anti-humano (Betil laboratories, Inc.). A continuación las proteínas marcadas se revelaron usando un anticuerpo secundario de burro anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare UK Ltd.) y aumento de la quimioluminiscencia (ECL). Los resultados mostraron que la proteína matriptasa se expresa en las líneas de células epiteliales respiratorias humanas Calu-3 y H292, y en menor medida en las células NHBE y 16-HBE cells (Figura 3). El peso molecular predicho de la matriptasa es de aproximadamente 75 kDa.

La localización celular de la matriptasa también se analizó mediante inmunofluorescencia. Una monocapa de células Calu-3 se cultivó en cubreobjetos y se tiñó con Hoechst (tinción del núcleo; Invitrogen Corp.), Dil (tinción de membranas; Invitrogen Corp.) y anticuerpo de matriptasa/ST14 de conejo anti-humano (Betil Laboratories Inc.) y anticuerpo de cabra anti-conejo con Alexa Fluor™-488 (Invitrogen Corp.). Los cubreobjetos se analizaron usando un microscopio de fluorescencia TE2000-U de Nikon™ y los filtros apropiados (Figura 4, panel superior). Además, las células Calu-3 se cultivaron en cámaras transpocillo hasta confluencia (uniones estrechas; resistencia eléctrica elevada). Las membranas transpocillo se retiraron y se colocaron en bloques de parafina. Se cortaron secciones de cinco micrómetros y se tiñeron con DAPI (tinción del núcleo) y anticuerpo de matriptasa de conejo anti-humano y Alexa-647 anti-conejo. La fluorescencia se detectó usando microscopía confocal (Figura 4, panel inferior). Los resultados confirmaron que la proteína matriptasa es expresada ciertamente por las células epiteliales de las vías respiratorias y que se localiza al menos en la membrana plasmática de estas células (Figura 4). Estos resultados están de acuerdo con que la matriptasa es una serina proteasa transmembrana de tipo II.

Ejemplo 2

LA MATRIPTASA ESTIMULA LA ESCISIÓN/ACTIVACIÓN DE HEMAGLUTININA DE GRIPE Y REPLICACIÓN VIRAL EN MÚLTIPLES CICLOS

Se realizaron experimentos para determinar si la matriptasa tiene el potencial para escindir las secuencias de HA de gripe. Se diseñaron sustratos peptídicos fluorescentes (IQFP) de ácido orto-Aminobenzoico (Abz) interrumpidos de forma interna basándose en secuencias consenso de las HA de gripe más relevantes para seres humanos (H1 y H3) con la estructura general Abz-XXXR↓GLFG-Tyr(3-NO₂) (SEQ ID NO: 6). La secuencia de H1 era Abz-IQSR↓GLFG-Tyr(3-NO₂) (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de H3 era Abz-KQTR↓GLFG-Tyr(3-NO₂) (SEQ ID NO: 8). La flecha que apunta hacia abajo representa el sitio de escisión entre el sitio de reconocimiento enzimático (P4-P1) y los primeros cuatro aminoácidos del péptido de fusión de gripe (P1'-P4'; conservados entre todas las cepas de gripe). Los IQFP que contenían secuencias de H1 o H3 de HA a concentración fija se incubaron con matriptasa recombinante tal como se ha descrito anteriormente (Beliveau, F., A. Desilets, y R. Leduc. 2009. *Febs J* **276**: 2213-2226). Los datos que se presentan en la Figura 5 indican que la matriptasa tiene el potencial para escindir las secuencias de H1 y H3 de gripe.

A continuación también se sometió a ensayo si la forma recombinante de matriptasa que contenía los restos 596-855 de SEQ ID NO: 2 producirán los laboratorios de los inventores (16), podría escindir la HA del virus A/Puerto Rico/8/34 (PR8) de la gripe (para este ensayo, se generó un virus con HA no escindida). Los virus HA0 se generaron como se describe en Klenk *et al.* 1984. Los virus HA0 se incubaron con matriptasa 500 nM (o tripsina 200 nM como control positivo) durante 2 h a 37 °C y las partículas virales se interrumpieron usando Triton X-100 a una concentración final de un 1 %. Las proteínas virales se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Usando un anticuerpo de proteína de conejo anti-viral específica de H1 (H1N1/Pan) y anticuerpo secundario anti-conejo-HRP, se revelaron bandas usando el reactivo ECL. HA0 indica HA sin escindir y HA1 representa el fragmento de HA1 de la HA escindida. Los resultados se presentan en la Figura 6 y muestran que la matriptasa era capaz de escindir la HA viral.

A continuación se sometió a ensayo si la forma recombinante de matriptasa mencionada anteriormente, podría sustituir la tripsina en el modelo de células MDCK de replicación de gripe usando el virus PR8. Este modelo celular necesita una proteasa exógena para activar la HA de la gripe y para apoyar la replicación en múltiples ciclos.

Las células MDCK se cultivaron hasta confluencia y se infectaron con 25 UFP del virus PR8 durante 1 h (para permitir la unión viral) en medio incompleto que contiene BSA. A continuación las células se lavaron y se añadió una solución al 1,8 % de celulosa microcristalina Avicel en MEM que contenía 43 nM de matriptasa (o tripsina 43 nM; control positivo) para permitir la formación de placas virales. 48 h más tarde, las células se lavaron y las células/placas virales se fijaron con fijador de Carnoy y se revelaron con una solución de violeta de cristal. Se hizo el recuento de las placas virales y los resultados se compararon. Los resultados que se presentan en la Figura 7 demuestran que la sustitución de tripsina por matriptasa (restos 596-855 que incluyen el dominio catalítico) como la proteasa exógena en el ensayo da como resultado una activación de la HA de la gripe y replicación del virus en múltiples ciclos. La eficacia de la matriptasa en comparación con la tripsina era de aproximadamente un 80 %. El panel en la parte izquierda inferior muestra una recopilación de resultados y la eficacia de IN-1 para inhibir la matriptasa en este ensayo (ningún efecto en la tripsina que indique selectividad). El panel C muestra una curva de concentración-respuesta de inhibición de formación de placas de PR8 en presencia de IN-1 en células MDCK suplementadas con Matriptasa (43 nM). Por lo tanto, estos resultados muestran que la matriptasa es capaz de soportar la replicación en múltiples ciclos de virus de gripe con alta eficacia en comparación con tripsina.

Dado que el ensayo mencionado anteriormente implicaba la adición de enzimas exógenas, se buscaba evaluar si la matriptasa está implicada en el soporte de la replicación en múltiples ciclos del virus de la gripe en un sistema que no necesita proteasas exógenas. La línea de células epiteliales de las vías respiratorias Calu-3 se usó para someter a ensayos de hipótesis.

Usando tecnología de ARN de interferencia, los ARNsi específicos para matriptasa humana se dirigieron en estas células. Las células Calu 3 se transfectaron con dos ARNsi diferentes (50 nmol, S1: s13520 (Ambion) símbolo genético ST14 de ARNsi Seleccionado Silencer®; S2: ST14 de direccionamiento a ARNesi (esiRNA1) MISSION® EHU012511 (Sigma-Aldrich)) dirigido hacia ARNm de matriptasa (secuencia diana de EHU012511: 5 ACGTCTGCTCATCACACTGATAACCAACACTGAGCGGGCCGATCCCGGCTTTGAGGCCACCTTCTTCCAGCT GCCTAGGATGAGCAGCTGTGGAGGCCGCTTACGTAAAGCCCAGGGGACATTCAACAGCCCCTACTACCCAGG CCACTACCCACCCAACATTGACTGCACATGGAACATTGAGGTGCCCAACACCAGCATGTGAAGGTGCGCTTC AAATTCTTCTACCTGCTGGAGCCCGGCTGCCTGCGG (SEQ ID NO: 5)) usando diversas concentraciones de Lipofectamina RNAiMAX™ (de 0,5 a 1,5 µl). Los ARNsi codificados se usaron como controles. 48 h después de la 10 transfección, se prepararon extractos de proteína celular. Los extractos se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se sondearon para expresión de proteína matriptasa usando un anticuerpo específico de matriptasa de conejo anti-humano. Las membranas se bloquearon usando leche seca sin grasa en Solución Salina Tamponada con Tris (TBS) con Tween™ 20. A continuación las membranas se marcaron con un anticuerpo específico de matriptasa de conejo anti-humano 15 (Betil laboratories, Inc.). Las proteínas marcadas se revelaron usando un anticuerpo secundario de burro anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare UK Ltd.) y aumento de la quimioluminiscencia (ECL).

Los resultados que se presentan en la Figura 8 demuestran que los dos ARNsi dirigidos a matriptasa independiente bloquean de forma significativa la expresión de proteína matriptasa. Usando 1,5 µl de Lipofectamina RNAiMAX™ 20 para transfección, los controles de ARNsi codificado (controles negativos AllStars, N.º Cat 1027280; Qiagen) presentaban poco o ningún efecto en la expresión de la proteína matriptasa, mientras que ambos ARNsi, 1 y 2, Bloqueaban de forma significativa la expresión de la proteína matriptasa en células Calu-3. El análisis densitométrico de las aplicaciones puntuales que se presentan en la Figura 8A desvelaban que los ARNsi dirigidos por matriptasa 25 inhibían de forma significativa la expresión de la proteína matriptasa en células Calu-3 48 h después del transfección. Las atenuaciones genéticas de la proteína matriptasa variaban entre un 80-90 % usando estos ARNsi (Figura 8B).

Se realizaron experimentos adicionales para someter a ensayos y está atenuación genética de matriptasa Podría 30 inhibir la replicación de la gripe. Las células Calu-3 se transfectaron (Lipofectamina RNAiMAX™ 1,5 µl) con los ARNsi, S1 y S2, y se han descrito anteriormente dirigidos a matriptasa 48 h antes de la infección (los ARNsi codificados se usaron como controles). Después de la transfección, las células se lavaron y se infectaron con virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (1000 UFP) durante 1 h para permitir la unión viral. A continuación las células se lavaron y se incubaron durante 48 h. Los sobrenadantes se recogieron y se sometieron al ensayo para partículas 35 virales infecciosas usando el sistema de MDCK/tripsina. El virus de la gripe se replicó hasta títulos elevados en células sin transfectar y con ARNsi codificado, pero la replicación estaba bloqueada de forma significativa en células transfectadas con ARNsi de matriptasa (Figura 9). Tomados en conjunto estos resultados muestran que la matriptasa, una serina proteasa transmembrana de tipo II, sitúa en la membrana plasmática de células epiteliales de las vías respiratorias (Figura 4) es capaz de estimular la replicación de la gripe en múltiples ciclos (Figuras 6, 7, y 9) 40 y es responsable de la activación de la hemaglutinina de la gripe en células epiteliales de las vías respiratorias, que son la diana de virus de la gripe.

Ejemplo 3

SÍNTESIS DE INHIBIDORES DE MATRIPTASA

Las realizaciones específicas de los inhibidores de la presente invención tienen una cadena principal peptídica e incluyen un resto de cabeza desprendible de ceto-benzotiazol. El resto de cetobenzotiazol está implicado en la 45 actividad inhibitoria de estos compuestos mientras que la cadena principal peptídica desempeña un papel en la selectividad para matriptasa con respecto a otras enzimas. La síntesis de inhibidores de cetobenzotiazol se hace a modo de ejemplo a continuación con IN-1 (compuesto 1), un potente inhibidor de matriptasa identificado por los 50 presentes inventores. Por supuesto la síntesis que se describe a continuación se puede adaptar para producir variantes de péptido-cetobenzotiazol o inhibidores de péptido-cetoheterocíclicos u otros derivados peptídicos, que están dentro del alcance de la presente invención.

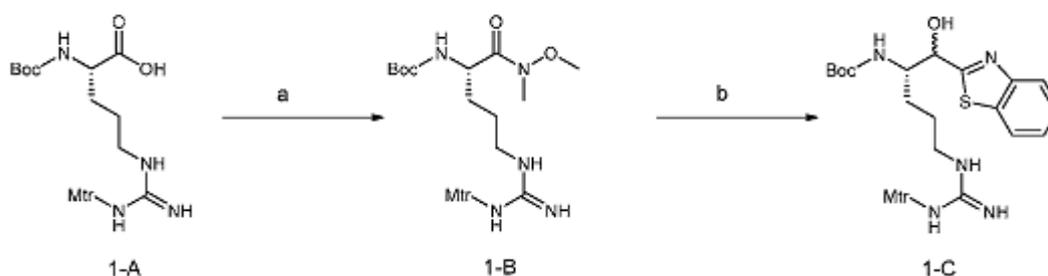
55 Materiales y Métodos (química). Los aminoácidos de los reactivos de acoplamiento se obtuvieron en ChemImpex Internacional (USA) y se usaron tal como se recibieron. Los reactivos los disolventes se adquirieron en proveedores comerciales y se usaron tal como se recibieron a menos que se indique de otro modo. Los disolventes se secaron como sigue a continuación: THF a partir de benzofenona sódica, DCM a partir de pentóxido de fósforo, y MeOH a partir de magnesio. La cromatografía ultrarrápida se realizó en sílice 60F254™ de Silicicle, cromatografía en capa 60 fina a partir de placas de CCM de vidrio de Silicicle. Los experimentos de HPLC analítica se realizaron en un instrumento 1100 series de Agilent™ equipado con detector de UV ajustado a 223 nm y una columna Eclipse Plus C18 de Agilent™ (3,0 x 50 mm, columna de tamaño de partícula esférica de 1,8 mm) con un gradiente lineal de 2-50 % de CH₃CN y H₂O que contenía TFA al 0,1 % (10 min), 50-100 % (4 min), 100 % (4 min), 100-2 % (1 min) y 2 % (3 min). Los productos finales se purificaron hasta > de un 95 % de pureza (HPLC-UV) por HPLC preparativa 65 (instrumento 126 de Beckman) usando una columna Vydac™ C18, 250 x 22 mm de ID, tamaño de partícula de 5 µm y un gradiente lineal de acetonitrilo que contenía TFA al 0,1 % a un caudal de 7 ml/min. Todos los inhibidores se

obtuvieron en forma de sales de ácido trifluoroacético (TFA) después de liofilización. Los pesos moleculares de los compuestos se confirmaron mediante espectrometría de masas (Electrospray micromass ZQ-2000 de Waters). Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se registraron en un ECX-300 (Bruker Inc., USA) a 300 MHz, y se indican con respecto a señales de disolvente interno.

5 Por vía sintética, compuesto **1** (IN-1, RQAR-cetobenzotiazol) y sus análogos se montaron de forma similar a la del método informado por Costanzo *et al.*, (*J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1984-2008) mediante acoplamiento peptídico de fragmento de P1 funcionalizado con cabeza desprendible con fragmento de P4-P2 protegido (Esquemas 1 a 4). La síntesis de IN-1 se muestra como un ejemplo. En primer lugar, el fragmento **1-C** que porta el elemento de inmovilización de serina se preparó a partir de la correspondiente amida de Weinreb **1-B**, mediante la adición de 2-litio-benzotiazol generado *in situ*. El cetobenzotiazol resultante se redujo en la misma operación con NaBH_4 como un medio para proteger el grupo ceto electrófilo, y a continuación el grupo Boc se desprotegió mediante acidólisis. En paralelo, el tosilato del éster de L-Ala bencilo se acopló con Fmoc-Gln-OH usando HATU para proporcionar el dipéptido **1-f**. Después de la retirada de Fmoc, el dipéptido en bruto se acopló con Boc-Arg(Mtr)-OH en presencia de EDC y HOBt para dar el tripéptido totalmente protegido correspondiente. A continuación la hidrogenólisis del éster de bencilo generó el fragmento deseado **1-H**. El acoplamiento posterior del tripéptido **1-H** con **1-C** de cabeza desprendible proporcionó el compuesto intermedio **1-K** (Esquema 3). A continuación el armazón tetrapeptídico **1-K** se oxidó con IBX (Frigerio, *et al.*, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7272-7276) seguido de acidólisis final de grupos protectores con HF. Los compuestos se obtuvieron generalmente en forma de mezclas de epímeros a 8:2 (Costanzo *et al.*, mencionado anteriormente), que se separaron mediante HPLC preparativa de fase inversa. Los análogos estructurales **2-7** (Tabla 7, que sigue a continuación) se obtuvieron de acuerdo con el mismo método de síntesis.

SÍNTESIS DE IN-1 (RQAR-cetobenzotiazol, compuesto 1 en la Tabla 7 que sigue a continuación)

Esquema 1



25 **Etapa a:**

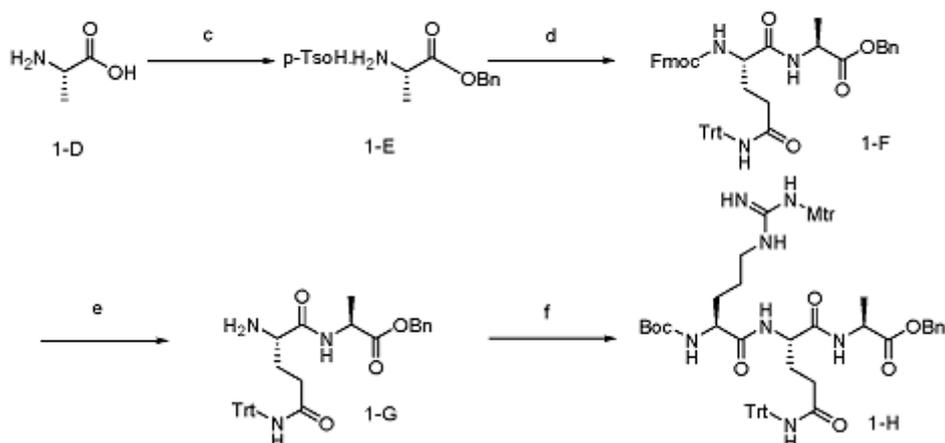
A una solución de Boc-Arg(Mtr)-OH (Esquema 1, compuesto 1-A, 1357,4 mg, 2,79 mmol, 1 equiv.) en THF anhidro (93 ml), se añadieron en atmósfera de nitrógeno (i) 1273,3 mg de HATU (3,35 mmol, 1,2 equiv.); (ii) 326,8 mg de HN(Me)OMe·HCl (3,35 mmol, 12 equiv.) e (iii) 2,4 ml de DIPEA (14 mmol, 5 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Después de finalizar la reacción, la mezcla se concentró al vacío y se purificó directamente por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con EtOAc/hexano (80:20 a 100:0) para dar la amida de Weinreb (Compuesto **1-B**) en forma de un sólido de color blanco (1,4 g, 93 %). HPLC: 10,98 min, 90 %. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 1,41 (s, 9H), 1,55-1,71 (m, 4H), 2,59 (s, 3H), 2,67 (s, 3H), 2,80 (s, 3H), 3,22 (s, 3H), 3,29-3,33 (m, 1H), 3,72 (s, 3H), 3,82 (s, 3H), 4,63 (t, 1H), 5,47 (d, 2H), 6,20-6,31 (m, 2H) 6,53 (s, 3H). RMN ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) δ 11,94, 18,20, 24,12, 24,59, 28,34, 32,13, 41,00, 49,31, 55,46, 61,65, 80,38, 111,77, 120,20, 124,91, 136,25, 138,77, 155,74, 156,62, 158,54. MS (ES) m/z 530,2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

40 **Etapa b:**

Una solución de benzotiazol (1,7 ml, 15,5 mmol, 18 equiv.) en 52 ml de THF anhidro se enfrió a $-75\text{ }^\circ\text{C}$ con agitación en atmósfera de nitrógeno. Se añadió butillitio (1,02 M en hexano, 14,8 ml, 15,1 mmol, 17,50 equiv.) gota a gota durante 30 min de -75 a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ y la mezcla se agitó durante un periodo adicional de 30 min de -75 a $-70\text{ }^\circ\text{C}$. A esta solución se añadió, gota a gota durante 50 min, una solución de la amida de Weinreb **1-B** (Esquema 1; 456 mg, 0,86 mmol, 1 equiv.) en 27 ml de THF secado de -75 a $-70\text{ }^\circ\text{C}$. La mezcla de reacción se agitó a $-75\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h. La reacción se interrumpió con 20 ml de NH_4Cl acuoso saturado, y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron sucesivamente con agua (3 x 50 ml) y solución salina saturada (2 x 50 ml, seca (MgSO_4)), se filtró a través de vidrio sinterizado, y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en MeOH seco (17,2 ml), se enfrió $-20\text{ }^\circ\text{C}$ mientras se agitaba y se trató con NaBH_4 (198 mg, 5,2 mmol, 6 equiv.). Después de 1 h, se añadió acetona (20 ml) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se repartió entre agua y EtOAc. La fase acuosa se extrajo con EtOAc (2 x 20 ml), y los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución salina saturada (2 x 20 ml), se secaron (MgSO_4), se

5 filtraron a través de vidrio sinterizado y se concentraron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con EtOAc/hexano (80:20 a 100:0) para dar hidroxibenzotiazol (Esquema 1, compuesto intermedio **1-C**) en forma de un sólido de color amarillo (322 g, 63 %). HPLC: 12,09 min, pureza de un 100 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,24 (s, 4H), 1,37 (s, 5H), 1,40-1,72 (m, 4H), 2,58 (s, 3H), 2,64 (s, 3H), 2,66 (s, 3H), 3,08-3,35 (m, 2H), 3,80 (s, 3H), 4,13 (t, 1H), 5,16 (s, 1H), 5,52 (d, 2H), 6,21-6,38 (m, 3H), 6,50 (s, 3H), 7,90 (d, 1H), 7,95 (d, 1H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) δ 11,9, 19,1, 23,2, 24,1, 26,9, 28,8, 40,9, 55,5, 60,4, 80,2, 112,1, 121,6, 122,5, 124,8, 124,9, 125,0, 126,9, 134,7, 136,7, 138,6, 152,7, 156,6, 157,1, 158,5, 173,0. MS (ES) m/z 606,1(MH)⁺.

Esquema 2



10

Etapa c:

15 A una solución de L-alanina (Esquema 2, compuesto **1-D**) (1151,2 mg, 12,9 mmol, 1,00 equiv.) en 51 ml de tolueno, se añadieron (i) 23 ml de BnOH; y (ii) 2457,6 g de APTS.H₂O (14,2 mmol, 1,10 equiv.). Venciendo un montaje de Dean-Stark y un condensador, la mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante una noche. Después de finalizar la reacción, la mezcla se concentró al vacío, se disolvió en EtOAc (20 ml) y se extrajo con HCl 1 M (3 x 20 ml). Los extractos combinados se lavaron con éter (4 x 20 ml), se ajustaron a pH 8-9 con NaHCO₃ y se extrajeron con EtOAc (4 x 20 ml). Los extractos combinados de EtOAc se secaron (MgSO₄), se filtraron a través de vidrio sinterizado y se concentraron al vacío. El residuo se cristalizó en una solución de APTS.H₂O (2457,6 mg, mmol, 1 equiv.) en 20 ml de éter dietílico para dar el compuesto intermedio **1-E** (Esquema 2) en forma de un sólido de color blanco (3260,0 mg, (72 %; MS (ES) m/z 180,1 (MH)⁺).

20

Etapa d:

25 A una solución de Fmoc-Gln(Trt)-OH (1,83 g, 3,0 mmol, 1 equiv.) en 30 ml de THF anhidro se añadieron 1,37 g de HATU (3,6 mmol, 1,2 equiv.), 1,05 g de H₂N-Ala-OBn (1,42 mmol, 1,0 equiv.), y 2,6 ml de DIPEA (15,0 mmol, 5,0 equiv.) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Después de finalizar la reacción, la mezcla se concentró al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida, (EtOAc/Hexano de 50:50 la 70:30) para dar el compuesto **1-F** en forma de un sólido de color blanco (2,07 g, 90 %). HPLC: 15,19 min, pureza de un 100 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,29 (d, 1H), 1,95-2,00 (m, 4H), 4,10-4,20 (m, 2H), 4,22-4,37 (m, 1H), 4,47-4,52 (m, 1H), 5,05-5,17 (m, 2H), 7,10-7,41 (m, 26H), 7,76 (d, 2H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) δ 17,56, 30,00, 33,29, 47,16, 48,28, 53,35, 66,99, 77,49, 119,97, 125,19, 127,08, 128,22, 128,68, 141,30, 144,47, 144,52, 170,97. MS (ES) m/z 794 (M+Na)⁺.

30

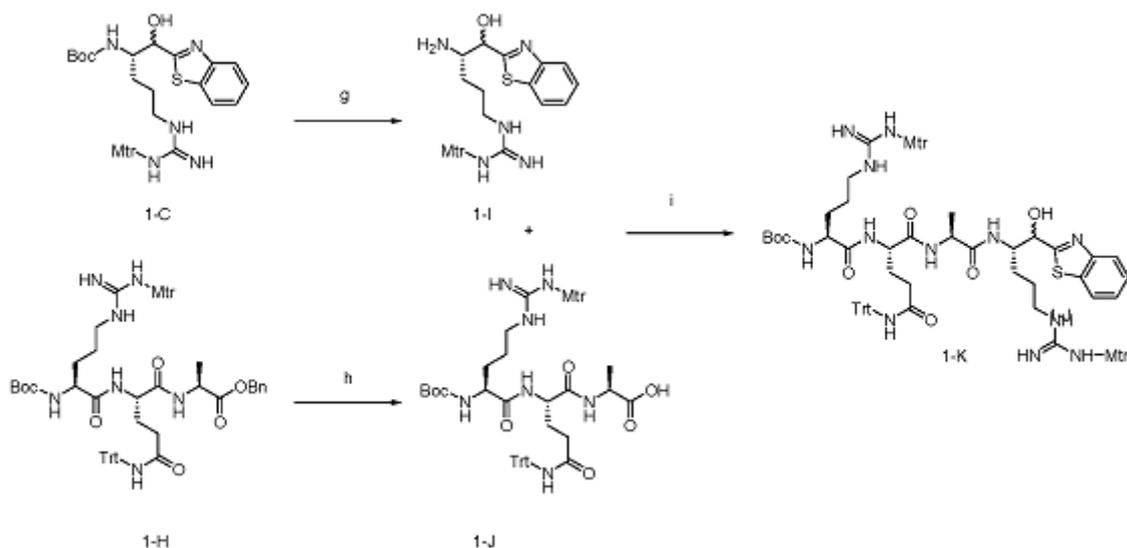
Etapa e-f:

35 Una solución de Fmoc-Gln(Trt)-Ala-OBn (1,06 mg, 1,37 mmol, 1 equiv.) en 13,2 ml de CH₂Cl₂/Et₂NH (90:10) se agitó durante 3 h a temperatura ambiente, y a continuación se concentró al vacío. El residuo se diluyó con CH₂Cl₂ (3 x 20 ml) y se concentró al vacío para dar el compuesto intermedio de amina libre en forma de un aceite incoloro. A una solución de 798 mg Boc-Arg(Mtr)-OH (1,64 mmol, 1,2 equiv.) en 14 ml de CH₂Cl₂ se añadieron 314 mg de EDC (1,64 mmol, 1,2 equiv.), 1,37 mmol de H₂N-Gln(Trt)-Ala-OBn (compuesto **1-G**, 1,00 equiv.) y 222 mg de HOBt (1,64 mmol, 1,2 equiv.). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después de la finalización, la mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc/Hexano de 80:20 a 100:0) para producir el compuesto intermedio **1-H** en forma de un sólido de color blanco (813 mg, 77 %). HPLC-UV: 14,48 min, pureza de un 80 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,28 (d, 2H), 1,36 (s, 10H), 1,58-1,66 (m, 1H), 2,42 (s, 3H), 2,59 (s, 3H), 2,63 (s, 3H), 3,02-3,18 (m, 1H), 3,77 (s, 3H), 4,08-4,15 (m, 1H), 4,34-4,41 (m, 2H), 4,95 (dd, 2H), 5,35 (d, 2H), 6,08-6,30 (s, 3H), 6,47 (s, 3H), 7,14-7,36 (m, 20H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) δ 11,0, 17,1, 18,4,

45

24,2, 25,2, 28,3, 29,8, 48,5, 52,7, 53,6, 55,4, 66,9, 77,5, 79,9, 111,7, 121,1, 126,9, 127,9, 128,9, 131,3, 135,3, 138,7, 144,3, 155,0, 155,6, 158,2, 172,5. MS (ES) m/z 1018,0 (M+H)⁺.

Esquema 3



5

Etapa g:

Una solución de Boc-Arg(Mtr)-benzotiazol, compuesto **1-C** (Esquema 3; 188,8 mg, 0,31 mmol, 1 equiv.) en 3,1 ml de CH₂Cl₂/TFA (8:2), se agitó a temperatura ambiente durante 1 y se concentró al vacío. El residuo se concentró muchas veces con CH₂Cl₂ (3 x 20 ml) para eliminar TFA and para dar el compuesto intermedio **1-I** (Esquema 3) en forma de un aceite de color amarillo.

Etapa h:

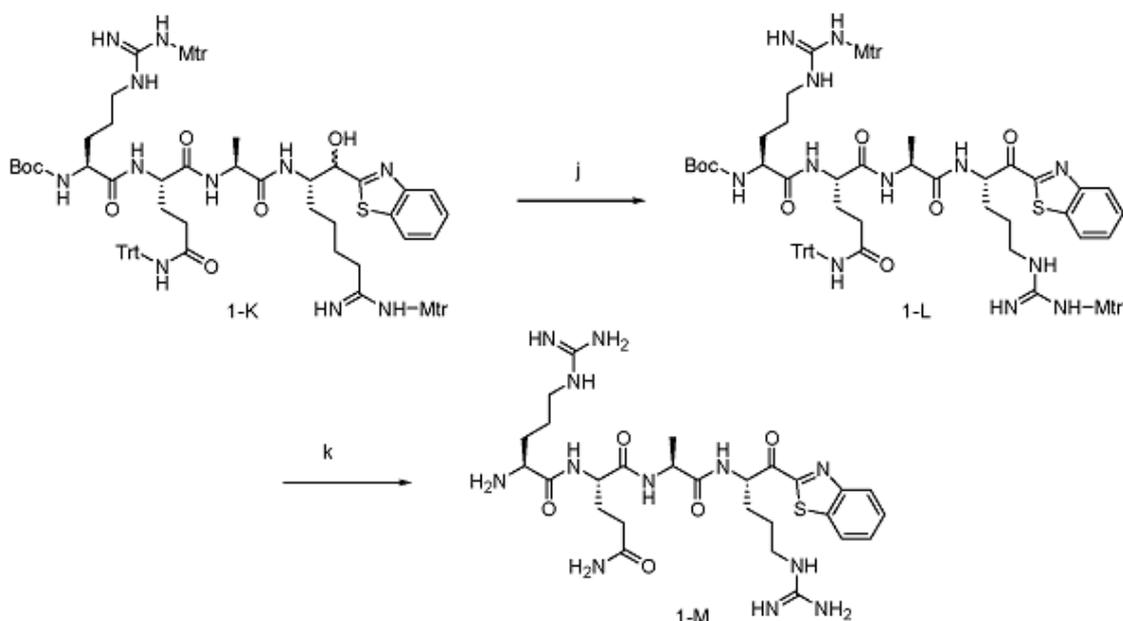
El compuesto intermedio **1-H** (320,7 mg, 0,31 mmol, 1 equiv.), Pd al 10 % sobre carbono activado (140 mg), Y EtOH absoluto (3,1 ml) se agitaron bajo una presión atmosférica de hidrógeno durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla resultante se filtró sobre tierra de diatomeas a través de vidrio sinterizado y se concentró al vacío para dar el compuesto **1-J** en bruto, que se usó como tal en la siguiente etapa.

Etapa i:

A una solución de Boc-Arg(Mtr)-Gln(Trt)-Ala-OH, compuesto **1-J** (Esquema 3; 0,31 mmol, 1 eq en DMF anhidra, se añadieron: (i) 353,6 mg de HATU (0,93 mmol, 3 equiv.); (ii) 0,31 mmol de hidroxibenzotiazol, compuesto **1-I** (Esquema 3, 1,00 equiv.); y (iii) 0,3 ml de DIPEA (1,55 mmol, 5 equiv.). La mezcla se agitó durante una noche, se concentró al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida, eluyendo con MeOH/EtOAc (95:5) para dar el compuesto **1-K** (Esquema 3; 366,2 g, 84 %) HPLC: 14,59 min, pureza de un 83 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (s, 9H), 1,39 (d, 3H), 1,47-1,60 (m, 6H), 2,04-2,15 (m, 2H), 2,33-2,58 (m, 10H), 2,84 (s, 6H), 2,97(s, 6H), 3,03-3,11 (m,2H), 3,82 (s, 9H), 4,04-4,10 (m, 1H), 4,18-4,28 (m, 2H), 4,30-4,49 (m,1H), 5,15 (d, 1H), 6,49 (s, 1H), 7,07-7,53 (m, 15H), 7,79-7,92 (m, 2H), 8,32 (d, 1H), 8,65 (d, 1H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) δ 11,97, 17,23, 18,59, 24,17, 28,06, 43,24, 55,51, 76,59, 77,43, 127,02, 127,94, 128,94, 128,60, 128,73, 144,10. MS (ES) m/z 1415,0 (M+H)⁺.

30

Esquema 4

**Etapa j:**

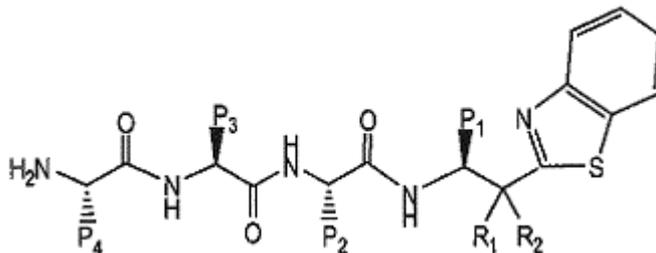
5 el reactivo IBX (84 mg, 0,3 mmol, 1,2 equiv.) se añadió a una solución de compuesto **1-K** (355 mg, 0,25 mmol, 1 equiv.) en 2,5 ml de DMSO. La mezcla resultante se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se lavó con agua (2 x 10 ml) y solución salina saturada (2 x 10 ml), se secó (MgSO₄), se filtró a través de vidrio sinterizado, y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc/Hexano de 80:20 a 100:0) para dar el compuesto 1-L en forma de un sólido de color amarillo (170 mg, 48 %). HPLC: 14,94 min, pureza de un 95 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,29 (s, 9H), 1,41 (d, 3H), 1,44-1,87 (m, 4H), 2,00-2,15 (m, 4H), 2,30-2,61 (m, 10H), 2,87 (s, 6H), 2,95 (s, 6H), 3,03-3,36 (m, 2H), 3,79 (s, 9H), 4,03-4,15 (m, 2H), 4,30-4,99 (m, 2H), 6,46 (s, 1H), 7,03-7,20 (m, 15H), 7,41-7,52 (m, 2H), 7,86 (d, 1H), 8,16 (d, 1H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) δ 11,97, 17,23, 18,59, 24,17, 28,06, 43,24, 55,51, 76,59, 77,43, 127,02, 127,94, 128,60, 128,73, 144,10. MS (ES) m/z 1414,0 (M+H)⁺.

Etapa K:

20 Una mezcla de Boc-Arg(Mtr)-Gln(Trt)-Ala-Arg(Mtr)benzotiazol (compuesto 1-L, 206 mg, 0,15 mmol, 1 equiv.) y anisol anhidro (200 µl) se puso en un tubo de reacción de teflón de un aparato HF y se enfrió a -78 °C. El HF anhidro (15-20 ml) se condensó en el tubo, y la temperatura se aumentó a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 3 h, se concentró al vacío, y se trituró con Et₂O (3 x 20 ml) para dar un sólido de color amarillo. Este sólido se purificó por HPLC de fase inversa, (agua/MeCN/TFA a 70:30:0,1), lo que permitió la separación de dos diastereoisómeros (88:12). El diastereómero principal **1-M (IN-1, Compuesto 1)** se obtuvo en forma de un sólido de color blanco después de liofilización (56 mg, 35 %). HPLC: 7,31 min, pureza de un 94 %. El segundo diastereómero se aisló en forma de un producto puro (8 mg, 6,87 min, pureza de un 95 %). RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 1,38 (d, 3H) 1,49-1,58 (m, 2H), 1,61-1,69 (m, 2H), 1,73-1,92 (m, 2H), 2,19-2,25 (m, 4H), 3,09-3,23 (m, 1H), 3,98 (t, 1H), 4,23-4,32 (m, 2H), 7,56-7,68 (m, 2H), 8,11 (d, 1H), 8,19 (d, 1H). RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) δ 17,44, 24,12, 24,73, 25,02, 27,94, 33,22, 39,74, 54,66, 55,49, 74,38, 76,60, 121,76, 124,80, 125,94, 144,09, 173,49, 177,48, 177,96. HRMS calculado para C₂₇H₄₂N₁₂O₅S: 647,3200; encontrado: 647,3228 (M+H)⁺.

SÍNTESIS DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE IN-1 (compuestos 2 a 7 en la Tabla 7 que sigue a continuación)

Tabla 7: Estructura de análogos estructurales de IN-1



| Compuesto N.º | P ₄ -P ₃ -P ₂ -P ₁ | R ₁ , R ₂ |
|---------------|--|---------------------------------|
| 1 | R-Q-A-R | = 0 |
| 2 | R-Q-A-R | H, OH* |
| 3 | R-Q-A-K | = 0 |
| 4 | Q-A-R | = 0 |
| 5 | A-R | = 0 |
| 6 | R | = 0 |
| 7 | R-Q-A(D)R | = 0 |

* mezcla de diastereoisómeros a 3:2, estereoquímica absoluta sin determinar.

2-(2-amino-5-carbamimidamidopentanamido)-N-(1-[[1-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-carbamimidamido-1-hidroxipentan-2-il]carbamoil]etil)pentanodiamida (compuesto 2)

5 El mismo método usado para el compuesto **1** (IN-1) S.A. descrito anteriormente se usó para sintetizar el compuesto **2**, que se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (7,2 mg, 30 %). HPLC: 6,08 min, 94 %. RMN ¹H (300 MHz, D₂O). δ 1,07 (d, 3H), 1,43-1,61 (m, 4H), 1,70-1,99 (m, 4H), 2,15-2,29 (m, 4H), 3,00-3,18 (m, 1H), 3,93 (t, 1H), 4,04-4,13 (m, 1H), 4,14-4,24 (m, 1H), 5,02 (d, 1H), 7,39-7,55 (m, 2H), 7,89 (d, 1H), 7,97-8,00 (m, 1H). RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) δ 17,62, 23,37, 24,37, 26,86, 27,94, 30,82, 40,33, 52,50, 53,07, 73,44, 172,36. HRMS calculado para C₂₇H₄₄N₁₂O₅S: 649,3351; encontrado: 649,3366 (M+H)⁺.

N-(1-[[6-amino-1-(1,3-benzotiazol-2-il)-1-oxohexan-2-il]carbamoil]etil)-2-(2-amino-5-carbamimidamido-pentanamido)pentanodiamida (RQAK-cetobenzotiazol, IN-2, compuesto 3 en la Tabla 7)

15 El mismo método que el usado para el compuesto **1** también se usó para sintetizar el compuesto **3** con adaptaciones apropiadas (Lisina en lugar de Arginina), que se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (6 mg, 42 %). HPLC: 5,11 min, 91 %. RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 1,36 (d, 6H), 1,42-1,54 (m, 4H), 1,61-1,80 (m, 4H), 1,98-2,12 (m, 4H), 2,21-2,31 (m, 4H), 2,94 (t, 1H), 3,84-3,94 (m, 1H), 4,23-4,32 (m, 1H), 4,34-4,45 (m, 1H), 7,59-7,70 (m, 2H), 8,11 (m, 1H), 8,19 (d, 1H), RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) δ 17,64, 22,42, 26,31, 26,80, 30,35, 30,94, 39,06, 40,20, 52,44, 54,98, 122,96, 124,89. HRMS calculado para C₂₇H₄₂N₁₀O₅S: 310,1603; encontrado: 310,1603 (M₂H⁺/2).

2-amino-N-(1-[[1-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-il]carbamoil]etil)pentanodiamida (compuesto 4)

25 El mismo método que el usado para el compuesto **1** se usó para sintetizar el compuesto **4** (con adaptaciones apropiadas), que se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (10,0 mg, 30 %). El segundo diastereómero también se aisló en forma de un producto puro (2,1 mg, 6,38 min, pureza de un 93 %). HPLC: 7,31 min, pureza de un 94 %. RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 1,36 (d, 3H) 1,58-1,62 (m, 2H), 1,91-1,96 (m, 2H), 2,11 (d, 2H), 2,20-2,25 (m, 2H), 3,17 (d, 2H), 3,97 (d, 1H), 4,14-4,25 (m, 1H), 4,35 (c, 1H), 7,43-7,57 (m, 2H), 8,09 (d, 1H), 8,14 (d, 1H). RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) δ 16,47, 24,62, 26,44, 29,89, 30,22, 40,61, 52,13, 122,52, 122,89, 124,85, 127,81, 136,71, 152,61, 156,66, 163,98, 174,58, 176,80, 193,38. HRMS calculado para C₂₇H₄₂N₁₀O₅S: 491,2189; encontrado: 491,2161(M+H)⁺.

N-[1-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-il]-2-acetamidopropanamida (compuesto 5)

35 El mismo método que el usado para el compuesto **1** se usó para sintetizar el compuesto **5** (con adaptaciones apropiadas), que se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (10,8 mg, 30 %). El segundo diastereómero

también se aisló en forma de un producto puro (5,1 mg, 8,04 min, pureza de un 99 %). HPLC: 8,29 min, pureza de un 97 %. RMN ¹H (300 MHz, D₂O) δ 1,29 (d, 3H), 1,52-1,63 (m, 2H), 1,77-1,82 (m, 2H), 1,86 (s, 3H), 3,15 (t, 2H), 4,07 (d, 1H), 4,21 (c, 1H), 7,43-7,59 (m, 2H), 8,06 (d, 1H), 8,12 (d, 1H), RMN ¹³C (75,4 MHz, D₂O) δ 16,51, 21,49, 24,34, 27,56, 40,36, 49,93, 55,22, 122,85, 124,77, 125,12, 136,66, 152,53, 156,66, 163,92, 173,99, 175,41, 193,26. HRMS calculado para C₁₈H₂₄N₆O₃S: 405,1709; encontrado: 405,1683 (M+H)⁺.

N-[1-(1,3-benzotiazol-2-il)-5-carbamimidamido-1-oxopentan-2-il]acetamida (compuesto 6)

El mismo método que el usado para el compuesto **1** se usó para aislar el compuesto **6** (con adaptaciones apropiadas), que se obtuvo en forma de un sólido de color blanco (6,2 mg, 48 %). HPLC: 8,22 min, pureza de un 99 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 1,52-1,68 (m, 2H), 1,97-2,08 (m, 2H), 2,11 (s, 3H), 3,16 (t, 2H), 5-35-5,50 (m, 1H), 7,43-7,59 (m, 2H), 8,08 (d, 1H), 8,17 (d, 1H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃) δ 21,47, 24,26, 27,76, 40,33, 55,36, 122,89, 124,84, 127,83, 136,78, 148,14, 152,66, 163,80, 174,27, 193,91). HRMS calculado para C₁₅H₁₉N₅O₂S: 334,1332; encontrado: 334,1340 (M+H)⁺.

Ejemplo 4

LOS TETRAPÉPTIDOS DE CETOBENZOTIAZOL INHIBEN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MATRIPTASA

Procedimientos experimentales

Materiales

La matriptasa humana recombinante purificada, matriptasa-2, hepsina y furina se prepararon como se ha descrito (1,2). La tripsina y la trombina bovinas son de Sigma-Aldrich.

Métodos Cinéticos Generales

En el siguiente tampón de reacción se realizaron ensayos enzimáticos: HEPES 50 mM, pH 7,4 que contenía 500 µg/ml de albúmina de suero bovino. Las actividades enzimáticas se monitorizaron por medición de la liberación de fluorescencia de un resto de amido metil cumarina (AMC) (excitación, 360 nm; emisión, 441 nm) de Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (50 µM) (Bachem Biosciences, King of Prussia, PA) durante 20 min a 37 °C en un lector de microplacas FLX-800 TBE™ (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT).

Inhibición de matriptasa con tetrapéptidos de cetobenzotiazol

La matriptasa humana purificada recombinante (aminoácidos 596-855) (1 nM) se incubó con vehículo (DMSO al 1 %) o 1 µM de inhibidores IN-1 (RQAR-cetobenzotiazol, Compuesto **1**) e IN-2 (RQAK-cetobenzotiazol, compuesto **3**) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La actividad enzimática se midió durante 20 minutos a 37 °C usando 50 µM de Boc-Gln-Ala-Arg-AMC como un sustrato. La reacción se realizó en un tampón HEPES 50 mM (pH 7,4) contenía 5 µg/ml de BSA.

Para la determinación de la CI₅₀, la actividad enzimática residual (V_i/V₀) se representó como una función de la transformación log de la concentración de inhibidor (log I). Los datos se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal usando el software GraphPad Prism 5™. La CI₅₀ corresponde a la concentración de inhibidor necesaria para reducir la actividad enzimática máxima en un 50 %.

Los resultados muestran que la matriptasa se inhibe de forma eficaz con IN-1 y en menor medida con IN-2 (Figura 10). IN-1 inhibió casi completamente la actividad de matriptasa en comparación con el control, mientras que IN-2 inhibió aproximadamente un 25 % de la actividad de matriptasa a 1 µM.

Para evaluar adicionalmente el perfil inhibitor, la disociación del complejo de enzima:inhibidor (EI) se investigó usando experimentos de dilución (Bieth, J. G. *Methods. Enzymol.* **1995**, *248*, 59-84). La disociación del complejo de enzima-inhibidor (EI) se investigó usando experimentos de recuperación de dilución. La concentración elevada de matriptasa (0,5 µM) con concentración variable de A) IN-1 (Compuesto **1**) o B) EGR-CMK se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente en tampón de reacción para permitir la formación del complejo EI. Los complejos se diluyeron rápidamente (1:2000) en un tampón de reacción que contenía 400 µM de Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (~7 veces Km). La lactida se registró continuamente durante 75 minutos y la fluorescencia se representó como una función del tiempo.

Las Figuras 11A y 11B informan de la comparación de las curvas de disociación para IN-1 (compuesto **1**) (Fig. 11A) y el inhibidor irreversible Glu-Gly-Arg clorometil cetona (EGR-CMK) (Fig. 11B). La curva de disociación de EGR-CMK presenta una relación lineal del producto con respecto al tiempo, indicativa de inhibición irreversible. Por el contrario, la curva de disociación de IN-1 (compuesto **1**) muestra una forma exponencial, lo que sugiere la disociación del complejo de enzima:inhibidor. En conjunto, estos datos confirman la formación lenta, de unión estrecha, lenta de un complejo entre inhibidor y enzima. Esto proporciona la ventaja de un mejor control de la inhibición.

Para caracterizar adicionalmente la inhibición de matriptasa con IN-1 (compuesto **1**), la constante de inhibición (K_i) se determinó usando la ecuación de Morrison a la inhibición de unión estrecha reversible (Bieth, J. G. *Methods. Enzymol.* **1995**, *248*, 59-84). Para evaluar la potencia de la inhibición de los compuestos de cetobenzotiazol con respecto a proteasas, 1 nM de enzimas se añadió al tampón de reacción que contenía 0 nM, 10 nM o 10 μ M de los diferentes cetobenzotiazoles (0,4 μ M, 4 μ M y 400 μ M a la forma reducida de RQAR-cetobenzotiazol (Compuesto **2**) y 100 μ M de Boc-Arg-Arg-Val-Arg-AMC para furina y 100 μ M de Boc-Gln-Ala-Arg-AMC para las otras proteasas. Si se producía una inhibición sustancial usando una proporción de I/E < 10, los compuestos se trataban como inhibidores de unión estrecha (Bieth, J.G., *Methods. Enzymol.* **1995**, *248*, 59-84). Para la determinación de K_i de inhibidores de unión estrecha, las enzimas diluidas a concentraciones que variaban de 0, 25 a 1 nM se equilibraron previamente en condiciones apropiadas de los compuestos durante 15 minutos a temperatura ambiente. La actividad enzimática residual se midió a continuación siguiendo la hidrólisis del sustrato fluorogénico Boc-Gln-Ala-Arg-AMC durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se hizo el promedio de los datos de al menos tres experimentos independientes y las velocidades residuales se representaron como una función de la concentración de inhibidor. Los datos se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal a la ecuación de K_i de Morrison (1):

$$v_i/v_o = v_o * (1 - (((E_o + I_o + K_{iap}) - (((E_o + I_o + K_{iap})^2 - 4 * E_o * I_o)^{1/2}) / (2 * E_o))), (1)$$

en la que v_o y v_i son las tasas del estado estacionario de la hidrólisis del sustrato en ausencia y presencia de inhibidores, respectivamente, E_o , la concentración inicial de enzima, I_o , la concentración inicial de inhibidor y K_{iap} La constante de disociación en equilibrio dependiente del sustrato. La constante independiente del sustrato K_i se calculó usando la ecuación (2):

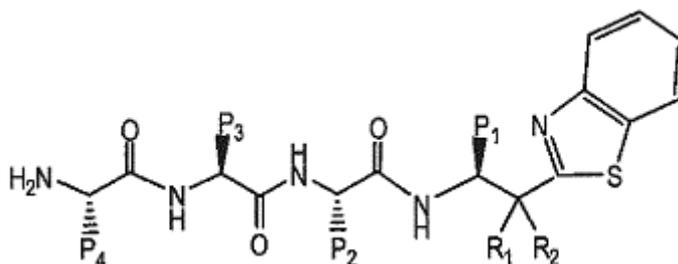
$$K_{iap} = (K_i * (1 + (S/K_m))), (2)$$

en la que S es la concentración inicial de sustrato y K_m es la constante de Michaelis-Menten para la interacción de enzima-sustrato.

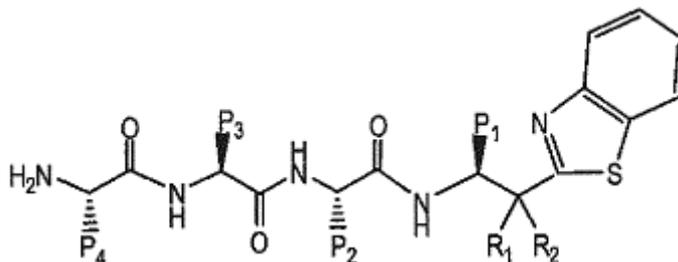
Si se produjera una inhibición sustancial solamente cuando se usa una proporción de I/E > 10, los compuestos se tratarían como inhibidores reversibles clásicos. En este caso, los ensayos de inhibición usados para la determinación de K_i se iniciaron mediante la adición de 1 nM de proteasa a una mezcla de reacción que contenía el inhibidor y el sustrato fluorogénico. Los datos generados a partir de representaciones de velocidad enzimática con respecto a concentración de sustrato a varias concentraciones fijas de inhibidor se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal con respecto ecuaciones que describen un modelo de inhibición competitiva, acompetitiva, no competitiva y mixta (Copeland, R. A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. Wiley-VCH, New-York, 2000, capítulo 10, pp 1-397.). Para inhibición de matriptasa con el compuesto **6** (R-Benzo) y trombina con el compuesto **1** (RQAR-Benzo), el modelo preferente fue el modelo de inhibición mixta tal como se determina mediante la bondad del ajuste (R^2) y los criterios de información de Akaike (AICc) y por lo tanto se usaron para la determinación de K_i . Todos los análisis de regresión no lineal y estadísticos se realizaron usando la versión 5.04 de Graph-Pad™ Prisms para Windows (GraphPad, Software San Diego, CA, USA).

En estas condiciones, el compuesto de RQAR-cetobenzotiazol **1** mostraba una potencia elevada para matriptasa, con una K_i de 0,011 nM (Tabla 8). Posteriormente se realizó un análisis preliminar de Relaciones de Estructura-Actividad (SAR) explorando la posición P1. Para confirmar el papel del grupo cetona a la inhibición de matriptasa, se midió la actividad inhibitoria de una forma reducida del RQAR-cetobenzotiazol con respecto a matriptasa (compuesto **2**, Tabla 8). El compuesto **2** reducido (mezcla de diastereoisómeros a 3:2 en la posición del alcohol, estereoquímica absoluta sin determinar) presentaba una inhibición débil. De hecho, una proporción estequiométrica de I/E > 1000 era necesaria para observar una inhibición sustancial, tal como se declara con una K_i de 6,1 μ M, que contrasta con la forma oxidada mucho más potente del compuesto **1** y que es coherente con un mecanismo de elemento de inmovilización de serina funcional.

Tabla 8: Relaciones de estructura-actividad de inhibidores de matriptasa



| Compuesto N.º | P ₄ -P ₃ -P ₂ -P ₁ | R ₁ , R ₂ | K _i (nM) |
|---------------|--|---------------------------------|------------------------------|
| 1 | R-Q-A-R | = 0 | 0,011 ^{tb} ± 0,0004 |



| Compuesto N.º | P ₄ -P ₃ -P ₂ -P ₁ | R ₁ , R ₂ | K _i (nM) |
|---------------|--|---------------------------------|-----------------------------|
| 2 | R-Q-A-R | H, OH* | 6124 ^{mm} ± 2702 |
| 3 | R-Q-A-K | = 0 | 9,5 ^{tb} ± 1,3 |
| 4 | Q-A-R | = 0 | 0,088 th ± 0,010 |
| 5 | A-R | = 0 | 1,4 ^{tb} ± 0,3 |
| 6 | R | = 0 | 457 ^{mm} ± 132 |
| 7 | R-Q-A-(D)R | = 0 | 4,6 ^{tb} ± 0,8 |

Los valores de K_i se determinaron como se ha descrito anteriormente (tb: unión estrecha, mm: modelo mixto). Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron por triplicado y representan la media ± desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. * mezcla de diastereoisómeros a 3:2, estereoquímica absoluta sin determinar.

La Tabla 8 informa de la influencia de variaciones estructurales del compuesto **1** en la inhibición de matriptasa. Para discernir la importancia de la estereoquímica en la posición P1, el análogo R-Q-A-(D)R (compuesto **7**) se sometió a ensayo y todavía era activo en el intervalo nanomolar, pero presentaba una inhibición inferior a 400 veces con respecto al compuesto **1**. Una sustitución de Arg por Lys en la posición P1 dio como resultado una disminución de la K_i de aproximadamente 3 órdenes de magnitud (comparar los compuestos **1** y **3**). Además, para discernir mejor la contribución respectiva de los restos P₄, P₃ y P₂ sobre el perfil inhibitorio, la porción peptídica se truncó con uno, dos y tres restos partiendo del extremo N-terminal (compuestos **4-6**). La delección del resto P₄ proporcionó un compuesto que conserva el perfil de un inhibidor de unión estrecha, aún con una potencia disminuida en 8 veces en comparación con el compuesto **1** (compuesto **4**, K_i = 0,088 nM *con respecto a* 0,011 nM para el compuesto **1**). El compuesto **5**, en el que los restos P₄ y P₃ se sometieron a delección de forma simultánea, sigue siendo un inhibidor de unión estrecha con una potencia reducida en 127 veces en comparación con el compuesto **1** (K_i = 1,4 nM con respecto a 0,011 nM). Por último, el compuesto **6**, en el que se retira la porción tripeptídica de P₄-P₂, es significativamente menos potente, con una K_i de 457 nM, con respecto a 30.000 veces menos potente que el compuesto **1**. Además, el compuesto **6** ya no se comporta como un inhibidor de unión estrecha sino como un inhibidor que posee un modo mixto de inhibición tal como se determina mediante análisis de ajuste global para diferentes modos de inhibición.

Inhibición de matriptasa con tetrapéptidos de cetobenzotiazol en *cellulo*

A continuación, la capacidad de IN-1 (compuesto **1**) para inhibir la actividad de matriptasa en células humanas se sometió a ensayo. Se transfectoron células de riñón embrionario humano (HEK293) con 6 µg de pcDNA3.1TM (Simulado) o pcDNA3.1TM-matriptasa (Matriptasa) usando el reactivo Lipofectamina 2000TM (Invitrogen) en placas de 10 cm. Después de una transfección de 24 h, el medio se reemplazó por medio sin suero (medio 293 SFM IITM (Invitrogen)) en presencia o ausencia (vehículo) del IN-1 (compuesto **1**). Después de 24 h de incubación, el medio se incubó con sustrato de Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (50 µM) y la fluorescencia se midió durante 20 minutos a 37 °C. La actividad enzimática se determinó en términos de unidades de fluorescencia liderada por minuto por ml de medio para cada condición.

Los resultados muestran que IN-1 (compuesto **1**) inhibe de forma eficaz la actividad de matriptasa en células cultivadas a 1 µM (aproximadamente un 50 % de inhibición) y 10 µM (casi un 100 % de inhibición; la actividad de matriptasa se devuelve a nivel de fondo) (Figura 12).

Ejemplo 5

SELECTIVIDAD DE INHIBIDORES DE MATRIPTASA

La selectividad/especificidad de péptidos de cetobenzotiazol de la presente invención para actividad de matriptasa se sometió a ensayo. Diversas proteasas (matriptasa; matriptasa-2; hepsina; trombina; tripsina y furina a una concentración de 1 nM), se incubaron con vehículo (DMSO al 1 %) o 1 μ M de compuesto IN-1 durante 10 minutos a temperatura ambiente. La actividad proteolítica se monitorizó mediante la adición del sustrato peptídico de Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (50 μ M) durante 20 minutos a 37 °C. Los datos se presentan como actividad relativa en comparación con la reacción de control (vehículo = 1) (Figura 13A).

Las Cl_{50} de IN-1 para matriptasa y hepsina también se determinaron (Figuras 13B y C). Para la determinación de Cl_{50} de IN-1 para matriptasa (Figura 13B) and hepsin (Figura 13C), diferentes concentraciones de inhibidores se incubaron con SNM de enzima. Las actividades relativas (V_i/V_o) se representaron con una función de la transformación log de la concentración de inhibidor (log I). Los datos se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal usando el software GraphPad Prism 5™. La Cl_{50} corresponde a la concentración de inhibidor que da como resultado una respuesta a medio camino entre la respuesta máxima y la respuesta máximamente inhibida. El valor de la Cl_{50} del inhibidor era aproximadamente 29 nM para matriptasa mientras que para hepsina era aproximadamente 540 nM (es decir más de 18 veces que para matriptasa).

El perfil de selectividad del compuesto **1** para matriptasa con respecto a otras serina proteasas, incluyendo serina proteasas transmembrana de tipo II (TTSP), también se determina midiendo la K_i experimental, usando el método que se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 9 que sigue a continuación. La selectividad se expresó como la proporción de las K_i . Se encontró que el compuesto **1** era selectivo para matriptasa con respecto a otras enzimas: tripsina (88 veces proteasa N.º 5 en la Tabla 9), hepsina (100 veces proteasa N.º 3 en la Tabla 9), matriptasa-2 (300 veces proteasa N.º 2 en la Tabla 9), TMPRSS11D (764 veces proteasa N.º 4 en la Tabla 9), trombina (> 30000 veces proteasa N.º 6 en la Tabla 9) y furina (sin inhibición (NI)- proteasa N.º 7 en la Tabla 9). Estos resultados demuestran que IN-1 tiene una buena selectividad hacia matriptasa e inhiben otras proteasas relacionadas con una eficacia significativamente menor.

Tabla 9: Perfil de selectividad

| Proteasas | K_i (nM) | Selectividad otras K_i/K_i matriptasa |
|-----------|----------------------------------|--|
| 1 | 0,011 ^{tb} \pm 0,0004 | --- |
| 2 | 3,3 ^{tb} \pm 1,0 | 300 |
| 3 | 1,1 ^{tb} \pm 0,3 | 100 |
| 4 | 8,4 ^{tb} \pm 2,6 | 764 |
| 5 | 0,97 ^{tb} \pm 0,17 | 88 |
| 6 | 637 ^{mm} \pm 131 | > 300000 |
| 7 | NI (10 μ M) | --- |

Los valores de K_i se determinaron como se ha descrito anteriormente (tb: unión estrecha, mm: modelo mixto). Las mediciones de la actividad enzimática se realizaron por triplicado y representan la media \pm desviación estándar de al menos tres experimentos e independientes.

Para entender el modo preferente de acoplamiento del compuesto **1** en el sitio activo de matriptasa y racionalizar las Relaciones de Estructura-Actividad, se construyó un modelo molecular del compuesto **1** acoplado en la estructura de matriptasa de rayos X publicada (Figura 18). De acuerdo con este modelo de acoplamiento, la cadena lateral del resto de Arg en P1 está altamente estabilizada en una red de enlaces de hidrógeno, que incluye un puente salino con el resto Asp⁷⁹⁹ de matriptasa, un enlace de hidrógeno con Ser⁸⁰⁰ y enlaces de hidrógeno con la amida de la cadena principal de Gly⁸²⁷ y Gly⁸²⁹. Esto puede representar la preferencia de Arg con respecto a Lys en P1, particularmente ya que parece que el bolsillo de S1 está mejor situado para acomodar la cadena lateral de Arg en lugar de Lys, que es más larga y tiene una capacidad reducida de formación de enlaces de hidrógeno en comparación con Arg. La cadena lateral del resto de Gln en P3 del compuesto **1** forma puente sobre el resto de Arg en P1 para interactuar con Gln⁸⁰² en el bolsillo de S3. A continuación, la cadena lateral del resto de Arg en P4 del compuesto **1** interactúa con la cadena lateral de Asp⁸²⁸ de matriptasa a través de un puente salino. También interactúa con Gln⁷⁸³ a través de formación de enlaces de hidrógeno. Por último, el resto catalítico de Ser⁸⁰⁵ se coloca de forma adecuada en las proximidades del resto carbonilo del grupo cetobenzotiazol para formar un enlace covalente, reversible en forma de un hemiacetal. El átomo de oxígeno del grupo carbonilo se estabiliza a través de la formación de enlaces de las amigas de la estructura principal de los restos Gly⁸⁰³ y Ser⁸⁰⁵.

Ejemplo 6**LOS TETRAPÉPTIDOS DE CETOBENZOTIAZOL INHIBEN LA REPLICACIÓN VIRAL DE LA GRIPE EN CÉLULAS EPITELIALES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS HUMANAS**

5 A continuación se sometió a ensayos y IN-1 (compuesto 1) era capaz de bloquear la replicación de la gripe *in vitro*, usando el sistema de MDCK/matriptasa exógena (Figuras 14 y 15) y el sistema de Calu-3 que no requiere proteasas exógenas (Figura 16).

10 En el sistema de células MDCK, IN-1 (compuesto 1) se añadió ya fuera 1 h o 5 h después de la unión viral en un experimento idéntico al que se presenta en la Figura 7 y al que se describe en el Ejemplo 2 que se ha mencionado anteriormente. Las células MDCK se cultivaron hasta confluencia y se infectaron con 25 UFP de virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 durante 1 h (para permitir la unión viral) en medio incompleto que contenía BSA. A continuación las células se lavaron y se añadió una solución al 1,8 % de celulosa microcristalina Avicel en MEM que contenía 15 43 nM de matriptasa (o tripsina 43 nM; control positivo) para permitir la formación de placas virales. El inhibidor de matriptasa IN-1 se añadió al ensayo 1 h después de la unión viral. 48 h después de la infección, las células se lavaron y las placas virales que fijaron con fijador de Carnoy y se revelaron con una solución de violeta de cristal. Se hizo el recuento de las placas virales y los resultados se compararon. Cuando se añadió IN-1 a 5 h después de la unión viral se obtuvieron resultados similares.

20 Los resultados mostraron que las concentraciones de 1 μ M y 10 μ M, IN-1 era capaz de anular completamente la replicación de la gripe soportada por matriptasa (Figuras 14 y 15).

25 En un experimento separado usando células Calu-3, IN-1 bloqueó la replicación de la gripe en más de un 50 % a 72 h después de la infección (Figura 16, panel superior), y la inhibición se consigue de una manera dependiente de la dosis (Figura 16, panel inferior). Las células Calu-3 se cultivaron hasta confluencia, se lavaron y se infectaron con el virus de la gripe A/Puerto Rico/8/34 (1000 UFP) durante 1 h para permitir la unión viral. Las células se lavaron a continuación y se incubaron durante 72 h en presencia o ausencia de IN-1 1 μ M (o DMSO como el control de vehículo). Los sobrenadantes se recogieron y se sometieron al ensayo para partículas virales infecciosas usando el sistema de ensayo de placas virales de MDCK/tripsina. El virus de la gripe se replicó a titulaciones elevadas en células sin tratar o tratadas con DMSO, pero la replicación estaba bloqueada de forma significativa en células tratadas con IN-1 (1 μ M). De forma interesante, IN-1 no tenía efecto en la replicación de la gripe cuando se usaba Cristina como la proteasa de activación lo que indica una actividad inhibitoria selectiva para IN-1 (Figura 15). La Figura 17 muestra la curva de concentración inhibitoria-respuesta de IN-1 en células Calu-3 infectadas con los virus de la gripe A/Hong Kong/X-31 o una cepa del virus H1N1 pandémico de 2009 aislado en Quebec durante la pandemia (A/similar a California/04/09). Estos resultados muestran que la inhibición de matriptasa inhibe la replicación de diferentes cepas de gripe.

REFERENCIAS

- 40 1. Cox, N. J., y K. Subbarao. 2000. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med* 51: 407-421.
2. De Clercq, E. 2006. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* 5: 1015-1025.
3. Hayden, F. G., y A. J. Hay. 1992. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr Top Microbiol Immunol* 176: 119-130.
- 45 4. Steinhauer, D. A., J. Martin, Y. P. Lin, S. A. Wharton, M. B. Oldstone, J. J. Skehel, y D. C. Wiley. 1996. Studies using double mutants of the conformational transitions in influenza hemagglutinin required for its membrane fusion activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 12873-12878.
5. Bullough, P. A., F. M. Hughson, J. J. Skehel, y D. C. Wiley. 1994. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371: 37-43.
- 50 6. Sollner, T. H. 2004. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 16:429-435.
7. Ferreira, D. F., M. P. Santo, M. A. Rebello, and M. C. Rebello. 2000. Weak bases affect late stages of Mavaro virus replication cycle in vertebrate cells. *Journal of Medical Microbiology* 49: 313-318.
8. Kido, H., T. Towatari, Y. Niwa, Y. Okumura, e Y. Beppu. 1996. Cellular proteases involved in the pathogenicity of human immunodeficiency and influenza viruses. *Adv Exp Med Biol* 389: 233-240.
9. Garten, W., y H. D. Klenk. 2008. *Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis*. Karger, Basilea, Suiza.
10. Klenk, H. D., y W. Garten. 1994. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* 2: 39-43.
- 60 11. Skehel, J. J., y D. C. Wiley. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 531-569.
12. Steinhauer, D. A. 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258: 1-20.
- 65 13. Stieneke-Grober, A., M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H. D. Klenk, y W. Garten. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *Embo*

J 11: 2407-2414.

14. Zambon, M. C. 2001. The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* 11: 227-241.

15. Bottcher, E., T. Matrosovich, M. Beyerle, H. D. Klenk, W. Garten, y M. Matrosovich 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* 80: 9896-9898.

16. Désilets, A., J. M. Longpré, M. E. Beaulieu, y R. Leduc. 2006. Inhibition of human matriptase by eglin c variants. *FEBS Letters* 580: 2227-2232.

17. Klenk HD, Garten W, Rott R. Inhibition of proteolytic cleavage of the hemagglutinin of influenza virus by the calcium-specific ionophore A23187. *EMBO J.* 1 de diciembre de 1984; 3 (12): 2911-2915.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SOCPRA Sciences sante et Humaines s.e.c.

RICHTER, Martin

LEDUC, Richard

COLOMBO, Eloic

MARSAULT, Eric

<120> INHIBIDORES DE MATRIPTASA Y USOS DE LOS MISMOS CONTRA INFECCIONES POR ORTOMIXOVIRUS

<130> 765/14692.37

<140> EP12793674.8

<141> 28-05-2012

<150> US 61/492.556

<151> 02-06-2011

<160> 32

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2568

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2568)

<400> 1

ES 2 676 412 T3

| | |
|---|-----|
| atg ggg agc gat cgg gcc cgc aag ggc gga ggg ggc ccg aag gac ttc | 48 |
| Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly Gly Gly Pro Lys Asp Phe | |
| 1 5 10 15 | |
| ggc gcg gga ctc aag tac aac tcc cgg cac gag aaa gtg aat ggc ttg | 96 |
| Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg His Glu Lys Val Asn Gly Leu | |
| 20 25 30 | |
| gag gaa ggc gtg gag ttc ctg cca gtc aac aac gtc aag aag gtg gaa | 144 |
| Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn Asn Val Lys Lys Val Glu | |
| 35 40 45 | |
| aag cat ggc ccg ggg cgc tgg gtg gtg ctg gca gcc gtg ctg atc ggc | 192 |
| Lys His Gly Pro Gly Arg Trp Val Val Leu Ala Ala Val Leu Ile Gly | |
| 50 55 60 | |
| ctc ctc ttg gtc ttg ctg ggg atc ggc ttc ctg gtg tgg cat ttg cag | 240 |
| Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Trp His Leu Gln | |
| 65 70 75 80 | |
| tac cgg gac gtg cgt gtc cag aag gtc ttc aat ggc tac atg agg atc | 288 |
| Tyr Arg Asp Val Arg Val Gln Lys Val Phe Asn Gly Tyr Met Arg Ile | |
| 85 90 95 | |
| aca aat gag aat ttt gtg gat gcc tac gag aac tcc aac tcc act gag | 336 |
| Thr Asn Glu Asn Phe Val Asp Ala Tyr Glu Asn Ser Asn Ser Thr Glu | |
| 100 105 110 | |
| ttt gta agc ctg gcc agc aag gtg aag gac gcg ctg aag ctg ctg tac | 384 |

ES 2 676 412 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Phe | Val | Ser | Leu | Ala | Ser | Lys | Val | Lys | Asp | Ala | Leu | Lys | Leu | Leu | Tyr | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | |
| agc | gga | gtc | cca | ttc | ctg | ggc | ccc | tac | cac | aag | gag | tcg | gct | gtg | acg | | 432 |
| Ser | Gly | Val | Pro | Phe | Leu | Gly | Pro | Tyr | His | Lys | Glu | Ser | Ala | Val | Thr | | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | | |
| gcc | ttc | agc | gag | ggc | agc | gtc | atc | gcc | tac | tac | tgg | tct | gag | ttc | agc | | 480 |
| Ala | Phe | Ser | Glu | Gly | Ser | Val | Ile | Ala | Tyr | Tyr | Trp | Ser | Glu | Phe | Ser | | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | |
| atc | cgc | cag | cac | ctg | gtg | gag | gag | gcc | gag | cgc | gtc | atg | gcc | gag | gag | | 528 |
| Ile | Pro | Gln | His | Leu | Val | Glu | Glu | Ala | Glu | Arg | Val | Met | Ala | Glu | Glu | | |
| | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | 175 | | | |
| cgc | gta | gtc | atg | ctg | ccc | ccg | cgg | gcg | cgc | tcc | ttg | aag | tcc | ttt | gtg | | 576 |
| Arg | Val | Val | Met | Leu | Pro | Pro | Arg | Ala | Arg | Ser | Leu | Lys | Ser | Phe | Val | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | | |
| gtc | acc | tca | gtg | gtg | gct | ttc | ccc | acg | gac | tcc | aaa | aca | gta | cag | agg | | 624 |
| Val | Thr | Ser | Val | Val | Ala | Phe | Pro | Thr | Asp | Ser | Lys | Thr | Val | Gln | Arg | | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | | |
| acc | cag | gac | aac | agc | tgc | agc | ttt | ggc | ctg | cac | gcc | cgc | ggt | gtg | gag | | 672 |
| Thr | Gln | Asp | Asn | Ser | Cys | Ser | Phe | Gly | Leu | His | Ala | Arg | Gly | Val | Glu | | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | | |
| ctg | atg | cgc | ttc | acc | acg | ccc | ggc | ttc | cct | gac | agc | ccc | tac | ccc | gct | | 720 |
| Leu | Met | Arg | Phe | Thr | Thr | Pro | Gly | Phe | Pro | Asp | Ser | Pro | Tyr | Pro | Ala | | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | | |
| cat | gcc | cgc | tgc | cag | tgg | gcc | ctg | cgg | ggg | gac | gcc | gac | tca | gtg | ctg | | 768 |
| His | Ala | Arg | Cys | Gln | Trp | Ala | Leu | Arg | Gly | Asp | Ala | Asp | Ser | Val | Leu | | |
| | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | | | |
| agc | ctc | acc | ttc | cgc | agc | ttt | gac | ctt | gcg | tcc | tgc | gac | gag | cgc | ggc | | 816 |
| Ser | Leu | Thr | Phe | Arg | Ser | Phe | Asp | Leu | Ala | Ser | Cys | Asp | Glu | Arg | Gly | | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | | |
| agc | gac | ctg | gtg | acg | gtg | tac | aac | acc | ctg | agc | ccc | atg | gag | ccc | cac | | 864 |
| Ser | Asp | Leu | Val | Thr | Val | Tyr | Asn | Thr | Leu | Ser | Pro | Met | Glu | Pro | His | | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | | |
| gcc | ctg | gtg | cag | ttg | tgt | ggc | acc | tac | cct | ccc | tcc | tac | aac | ctg | acc | | 912 |
| Ala | Leu | Val | Gln | Leu | Cys | Gly | Thr | Tyr | Pro | Pro | Ser | Tyr | Asn | Leu | Thr | | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | | |
| ttc | cac | tcc | tcc | cag | aac | gtc | ctg | ctc | atc | aca | ctg | ata | acc | aac | act | | 960 |
| Phe | His | Ser | Ser | Gln | Asn | Val | Leu | Leu | Ile | Thr | Leu | Ile | Thr | Asn | Thr | | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | | |
| gag | cgg | cgg | cat | ccc | ggc | ttt | gag | gcc | acc | ttc | ttc | cag | ctg | cct | agg | | 1008 |
| Glu | Arg | Arg | His | Pro | Gly | Phe | Glu | Ala | Thr | Phe | Phe | Gln | Leu | Pro | Arg | | |
| | | | 325 | | | | | | 330 | | | | | 335 | | | |
| atg | agc | agc | tgt | gga | ggc | cgc | tta | cgt | aaa | gcc | cag | ggg | aca | ttc | aac | | 1056 |
| Met | Ser | Ser | Cys | Gly | Gly | Arg | Leu | Arg | Lys | Ala | Gln | Gly | Thr | Phe | Asn | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| agc | ccc | tac | tac | cca | ggc | cac | tac | cca | ccc | aac | att | gac | tgc | aca | tgg | | 1104 |
| Ser | Pro | Tyr | Tyr | Pro | Gly | His | Tyr | Pro | Pro | Asn | Ile | Asp | Cys | Thr | Trp | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |

ES 2 676 412 T3

| | |
|---|------|
| aac att gag gtg ccc aac aac cag cat gtg aag gtg cgc ttc aaa ttc Asn Ile Glu Val Pro Asn Asn Gln His Val Lys Val Arg Phe Lys Phe 370 375 380 | 1152 |
| ttc tac ctg ctg gag ccc ggc gtg cct gcg ggc acc tgc ccc aag gac Phe Tyr Leu Leu Glu Pro Gly Val Pro Ala Gly Thr Cys Pro Lys Asp 385 390 395 400 | 1200 |
| tac gtg gag atc aat ggg gag aaa tac tgc gga gag agg tcc cag ttc Tyr Val Glu Ile Asn Gly Glu Lys Tyr Cys Gly Glu Arg Ser Gln Phe 405 410 415 | 1248 |
| gtc gtc acc agc aac agc aac aag atc aca gtt cgc ttc cac tca gat Val Val Thr Ser Asn Ser Asn Lys Ile Thr Val Arg Phe His Ser Asp 420 425 430 | 1296 |
| cag tcc tac acc gac acc ggc ttc tta gct gaa tac ctc tcc tac gac Gln Ser Tyr Thr Asp Thr Gly Phe Leu Ala Glu Tyr Leu Ser Tyr Asp 435 440 445 | 1344 |
| tcc agt gac cca tgc ccg ggg cag ttc acg tgc cgc acg ggg cgg tgt Ser Ser Asp Pro Cys Pro Gly Gln Phe Thr Cys Arg Thr Gly Arg Cys 450 455 460 | 1392 |
| atc cgg aag gag ctg cgc tgt gat ggc tgg gcc gac tgc acc gac cac Ile Arg Lys Glu Leu Arg Cys Asp Gly Trp Ala Asp Cys Thr Asp His 465 470 475 480 | 1440 |
| agc gat gag ctc aac tgc agt tgc gac gcc ggc cac cag ttc acg tgc Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala Gly His Gln Phe Thr Cys 485 490 495 | 1488 |
| aag aac aag ttc tgc aag ccc ctc ttc tgg gtc tgc gac agt gtg aac Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn 500 505 510 | 1536 |
| gac tgc gga gac aac agc gac gag cag ggg tgc agt tgt ccg gcc cag Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gln 515 520 525 | 1584 |
| acc ttc agg tgt tcc aat ggg aag tgc ctc tcc aaa agc cag cag tgc Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu Ser Lys Ser Gln Gln Cys 530 535 540 | 1632 |
| aat ggg aag gac gac tgt ggg gac ggg tcc gac gag gcc tcc tgc ccc Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro 545 550 555 560 | 1680 |
| aag gtg aac gtc gtc act tgt acc aaa cac acc tac cgc tgc ctc aat Lys Val Asn Val Val Thr Cys Thr Lys His Thr Tyr Arg Cys Leu Asn 565 570 575 | 1728 |
| ggg ctc tgc ttg agc aag ggc aac cct gag tgt gac ggg aag gag gac Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu Cys Asp Gly Lys Glu Asp 580 585 590 | 1776 |
| tgt agc gac ggc tca gat gag aag gac tgc gac tgt ggg ctg cgg tca Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys Asp Cys Gly Leu Arg Ser 595 600 605 | 1824 |
| ttc acg aga cag gct cgt gtt gtt ggg ggc acg gat gcg gat gag ggc Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly 610 615 620 | 1872 |

ES 2 676 412 T3

| | |
|---|------|
| gag tgg ccc tgg cag gta agc ctg cat gct ctg ggc cag ggc cac atc Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile 625 630 635 640 | 1920 |
| tgc ggt gct tcc ctc atc tct ccc aac tgg ctg gtc tct gcc gca cac Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His 645 650 655 | 1968 |
| tgc tac atc gat gac aga gga ttc agg tac tca gac ccc acg cag tgg Cys Tyr Ile Asp Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp 660 665 670 | 2016 |
| acg gcc ttc ctg ggc ttg cac gac cag agc cag cgc agc gcc cct ggg Thr Ala Phe Leu Gly Leu His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly 675 680 685 | 2064 |
| gtg cag gag cgc agg ctc aag cgc atc atc tcc cac ccc ttc ttc aat Val Gln Glu Arg Arg Leu Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn 690 695 700 | 2112 |
| gac ttc acc ttc gac tat gac atc gcg ctg ctg gag ctg gag aaa ccg Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro 705 710 715 720 | 2160 |
| gca gag tac agc tcc atg gtg cgg ccc atc tgc ctg ccg gac gcc tcc Ala Glu Tyr Ser Ser Met Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser 725 730 735 | 2208 |
| cat gtc ttc cct gcc ggc aag gcc atc tgg gtc acg ggc tgg gga cac His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His 740 745 750 | 2256 |
| acc cag tat gga ggc act ggc gcg ctg atc ctg caa aag ggt gag atc Thr Gln Tyr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile 755 760 765 | 2304 |
| cgc gtc atc aac cag acc acc tgc gag aac ctc ctg ccg cag cag atc Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile 770 775 780 | 2352 |
| acg ccg cgc atg atg tgc gtg ggc ttc ctc agc ggc ggc gtg gac tcc Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser 785 790 795 800 | 2400 |
| tgc cag ggt gat tcc ggg gga ccc ctg tcc agc gtg gag gcg gat ggg Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly 805 810 815 | 2448 |
| cgg atc ttc cag gcc ggt gtg gtg agc tgg gga gac ggc tgc gct cag Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln 820 825 830 | 2496 |
| agg aac aag cca ggc gtg tac aca agg ctc cct ctg ttt cgg gac tgg Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp 835 840 845 | 2544 |
| atc aaa gag aac act ggg gta tag Ile Lys Glu Asn Thr Gly Val 850 855 | 2568 |

<210> 2
<211> 855
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 211:38 20/01/2014

ES 2 676 412 T3

Met Gly Ser Asp Arg Ala Arg Lys Gly Gly Gly Gly Pro Lys Asp Phe
 1 5 10 15

Gly Ala Gly Leu Lys Tyr Asn Ser Arg His Glu Lys Val Asn Gly Leu
 20 25 30

Glu Glu Gly Val Glu Phe Leu Pro Val Asn Asn Val Lys Lys Val Glu
 35 40 45

Lys His Gly Pro Gly Arg Trp Val Val Leu Ala Ala Val Leu Ile Gly
 50 55 60

Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Ile Gly Phe Leu Val Trp His Leu Gln
 65 70 75 80

Tyr Arg Asp Val Arg Val Gln Lys Val Phe Asn Gly Tyr Met Arg Ile
 85 90 95

Thr Asn Glu Asn Phe Val Asp Ala Tyr Glu Asn Ser Asn Ser Thr Glu
 100 105 110

Phe Val Ser Leu Ala Ser Lys Val Lys Asp Ala Leu Lys Leu Leu Tyr
 115 120 125

Ser Gly Val Pro Phe Leu Gly Pro Tyr His Lys Glu Ser Ala Val Thr
 130 135 140

Ala Phe Ser Glu Gly Ser Val Ile Ala Tyr Tyr Trp Ser Glu Phe Ser
 145 150 155 160

Ile Pro Gln His Leu Val Glu Glu Ala Glu Arg Val Met Ala Glu Glu
 165 170 175

Arg Val Val Met Leu Pro Pro Arg Ala Arg Ser Leu Lys Ser Phe Val
 180 185 190

Val Thr Ser Val Val Ala Phe Pro Thr Asp Ser Lys Thr Val Gln Arg
 195 200 205

Thr Gln Asp Asn Ser Cys Ser Phe Gly Leu His Ala Arg Gly Val Glu
 210 215 220

Leu Met Arg Phe Thr Thr Pro Gly Phe Pro Asp Ser Pro Tyr Pro Ala

ES 2 676 412 T3

Ser Asp Glu Leu Asn Cys Ser Cys Asp Ala Gly His Gln Phe Thr Cys
 485 490 495

Lys Asn Lys Phe Cys Lys Pro Leu Phe Trp Val Cys Asp Ser Val Asn
 500 505 510

Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Gln Gly Cys Ser Cys Pro Ala Gln
 515 520 525

Thr Phe Arg Cys Ser Asn Gly Lys Cys Leu Ser Lys Ser Gln Gln Cys
 530 535 540

Asn Gly Lys Asp Asp Cys Gly Asp Gly Ser Asp Glu Ala Ser Cys Pro
 545 550 555 560

Lys Val Asn Val Val Thr Cys Thr Lys His Thr Tyr Arg Cys Leu Asn
 565 570 575

Gly Leu Cys Leu Ser Lys Gly Asn Pro Glu Cys Asp Gly Lys Glu Asp
 580 585 590

Cys Ser Asp Gly Ser Asp Glu Lys Asp Cys Asp Cys Gly Leu Arg Ser
 595 600 605

Phe Thr Arg Gln Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly
 610 615 620

Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile
 625 630 635 640

Cys Gly Ala Ser Leu Ile Ser Pro Asn Trp Leu Val Ser Ala Ala His
 645 650 655

Cys Tyr Ile Asp Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Ser Asp Pro Thr Gln Trp
 660 665 670

Thr Ala Phe Leu Gly Leu His Asp Gln Ser Gln Arg Ser Ala Pro Gly
 675 680 685

Val Gln Glu Arg Arg Leu Lys Arg Ile Ile Ser His Pro Phe Phe Asn
 690 695 700

Asp Phe Thr Phe Asp Tyr Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro
 705 710 715 720

Ala Glu Tyr Ser Ser Met Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser
 725 730 735

ES 2 676 412 T3

His Val Phe Pro Ala Gly Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His
 740 745 750

Thr Gln Tyr Gly Gly Thr Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile
 755 760 765

Arg Val Ile Asn Gln Thr Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile
 770 775 780

Thr Pro Arg Met Met Cys Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser
 785 790 795 800

Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly
 805 810 815

Arg Ile Phe Gln Ala Gly Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln
 820 825 830

Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp
 835 840 845

Ile Lys Glu Asn Thr Gly Val
 850 855

- 5 <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Oligonucleótido sintético

- <400> 3
- ctaggatgag cagctgtgga 20

- 15 <210> 4
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Oligonucleótido sintético

- <400> 4
- aagaatttga agcgcacctt 20

- 25 <210> 5
- <211> 255
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

- 30 <400> 5

ES 2 676 412 T3

```

acgtcctgct catcacactg ataaccaaca ctgagcggcg gcatcccggc tttgaggcca      60
ccttcttcca gctgcctagg atgagcagct gtggaggccg cttacgtaaa gccaggggga      120
cattcaacag cccctactac ccaggccact acccacccaa cattgactgc acatggaaca      180
ttgaggtgcc caacaaccag catgtgaagg tgcgcttcaa attcttctac ctgctggagc      240
ccggcgtgcc tgcggg                                     255

```

```

5  <210> 6
   <211> 9
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> Secuencia artificial

15 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (1)..(1)
   <223> Ácido orto-aminobenzoico (Abz)

20 <220>
   <221> misc_feature
   <222> (2)..(3)
   <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (9)..(9)
   <223> 3-NO2

   <400> 6

   Xaa Xaa Xaa Arg Gly Leu Phe Gly Tyr
   1           5

30 <210> 7
   <211> 9
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

35 <220>
   <223> Secuencia artificial

40 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (1)..(1)
   <223> Ácido orto-aminobenzoico (Abz)

45 <220>
   <221> MISC_FEATURE
   <222> (9)..(9)
   <223> 3-NO2

   <400> 7

```

Ile Gln Ser Arg Gly Leu Phe Gly Tyr
 1 5

5 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Acido orto-aminobenzoico (Abz)

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> 3-NO2

<400> 8

Lys Gln Thr Arg Gly Leu Phe Gly Tyr
 1 5

25 <210> 9
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

35 <400> 9

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25

40 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5 10

50 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL
 5 <400> 11

 Gly Val Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5 10

 <210> 12
 10 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 15 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

 <400> 12

 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10
 20
 <210> 13
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 25
 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

 <400> 13
 30
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 14
 <211> 17
 35 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL
 40
 <400> 14

 Ala Ile Ser Ser Ser Gly Val Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

 Gly

 <210> 15
 45 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

ES 2 676 412 T3

<220>

<223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<400> 15

5

Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Asn Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 16

<211> 16

10

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SECUENCIA ARTIFICIAL

15

<400> 16

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

20

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

25

<220>

<223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<400> 17

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys
1 5 10 15

30

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

35

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> SECUENCIA ARTIFICIAL

40

<400> 18

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
1 5 10 15

45

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

50

<220>

<223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<400> 19

ES 2 676 412 T3

Ile Ala Ser Ile Ala Leu Arg Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<400> 20

Ile Ala Ser Ile Ala Thr Arg Gly Tyr Phe Phe Asn Tyr
 1 5 10

15 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<400> 21

25 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

30 <210> 22
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

40 <210> 23
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

<400> 23

ES 2 676 412 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

5 <210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

10 <220>
<223> SECUENCIA ARTIFICIAL
<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

15 <210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

20 <220>
<223> SECUENCIA ARTIFICIAL
<400> 25

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

25 <210> 26
<211> 15
<212> PRT
30 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> SECUENCIA ARTIFICIAL
35 <400> 26

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

40 <210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

45 <220>
<223> SECUENCIA ARTIFICIAL
<400> 27

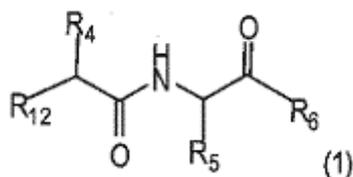
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

50

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 5
 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL
 <400> 28
 10
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 <210> 29
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 15
 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL
 20
 <400> 29
 Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 1 5 10 15
 25
 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 30
 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL
 <400> 30
 35
 Val Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 40
 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL
 <400> 31
 45
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5
 50
 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 55
 <220>
 <223> SECUENCIA ARTIFICIAL

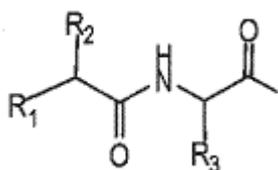
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (1):



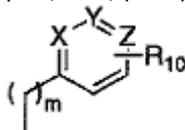
o una sal, hidrato, solvato, o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo,

en el que,



R₁₂ es NHR₇; en el que R₇ es

R₁ es H, NH₂ o NHR₇; en el que R₇ es un alquilo, arilo, (C=O)-alquilo, (C=O)-arilo, SO₂-alquilo o SO₂-arilo;



R₂ y R₅ son independientemente -CH₂-R₈ o

en el que R₈ es (CH₂)_n-NH(C=NH)NH₂;

n es 1 a 3;

m es de 0 a 3; y

R₁₀ es -C(=NH)-NH₂, NH₂ o NH alquilo;

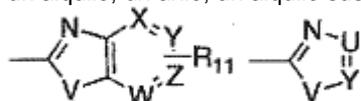
R₃ es:

un alquilo lineal;

un alquilo sustituido con (CO)NH₂, (CO)OH, NH₂, NHCO-alquilo, NHCO-arilo, NHSO₂-alquilo, NHSO₂-arilo o heteroarilo; o

un arilo o un arilo sustituido;

R₄ es un alquilo, un arilo, un alquilo sustituido o un arilo sustituido;



R₆ es , CF₃, CO₂H, CONH-alquilo, CONH-arilo o CONH-aminoácido;

en los que W, X, Y y Z son independientemente CH o N;

V y U son independientemente S, O, NH o NCH₃; y

R₁₁ es H, CO₂H, CONH-alquilo, CONH-arilo, arilo, heteroarilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R₁ es H o NH₂.

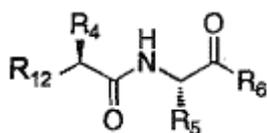
3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que R₃ es -(CH₂)₂C(=O)NH₂.

4. El compuesto de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que R₄ es un arilo sustituido.

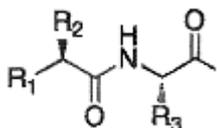
5. El compuesto de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que R₄ es un alquilo de C₁ a C₆.

6. El compuesto de la reivindicación 1, 2 o 3 en el que R₄ es CH₃.

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que el compuesto tiene la fórmula (1.1):



en la que



R₁₂ es NHR₇, en el que R₇ es ;

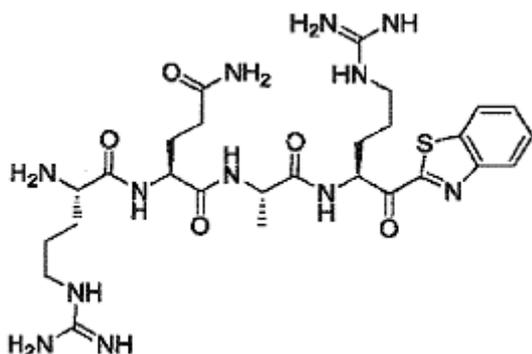
5

y

en el que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₈, R₁₀, R₁₁ y R₁₃ son como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10

8. El compuesto de la reivindicación 1, en la que el compuesto tiene la fórmula (3)



15

9. Una composición que comprende el compuesto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y

20

(a) un agente terapéutico adicional para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus y/o síntomas asociados, preferentemente dicha infección por ortomixovirus es una infección por gripe; y preferentemente dicho agente terapéutico adicional es un inhibidor del canal iónico M2 viral o un inhibidor de neuraminidasa, más preferentemente oseltamivir, zanamivir, laninamivir, peramivir, amantadina, rimantadina, vitamina C, Cold fX, equinácea, ginseng o cualquier combinación de los mismos;

25

(b) un excipiente farmacéuticamente aceptable; o

(c) una combinación de (a) y (b);

(d) en las que dicha composición se formula preferentemente para administración directa en los pulmones, preferentemente con un inhalador o nebulizador.

30

10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el tratamiento de una infección por ortomixovirus en un sujeto.

11. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el tratamiento de una infección por gripe en un sujeto.

35

12. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para el tratamiento de una infección por gripe de tipo A en un sujeto.

40

13. Un kit que comprende un compuesto como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de la reivindicación 9, e instrucciones para el uso del mismo para el tratamiento o la prevención de una infección por ortomixovirus en un sujeto, y en las que la infección por ortomixovirus es preferentemente una infección por gripe, más preferentemente una infección por gripe de tipo A.

A

(inicio)

atggggagcgatcgggcccgaagggcgagggggcccgaaggactcggcggggactcaagtacaactcccggcacgaaaagtgaatg
gcttggaggaaaggcggtggagttcctgccagtcacaacgtcaagaaggaggaaaagcatggcccggggcgctgggtggtgctggcagccgtgct
gatcggcctccctcttggcttggctgggagcggcttctgggtggtgcaatggcagttaccgggacgtgctggtccagaaggcttcaatggctacatgag
gatcacaatgagaatttggatgacctacgagaactcaactcaactgagttgtaagcctggccagcaagggtgaaggacgcgtgaaagtgcgtg
acagcgggagtcceattctgggcccctaccacaaggagtcggctgtgacggccttcagcggggcagcgtcctcctactactggtctgagttcag
catcccgcagcacctgggtggaggggcggagcgcgtcatggccgaggagcgcgtagtcctgctgcccccgggcgccgctcctgaaagtcttgg
tggtaacctcagtggtgcttcccaaggactcacaacaglacagaggaccagacaacagctcagccttggcctgcaagcccgggtggtgg
agctgatgccttcaacagcccggcttccctgacagcccctaccctcctcatgcccggctgcccagttggccctggcgggggagccgactcagtg
ctgagcctcacttccgagcttggacttggctctgacgagcggggcagcgaactggtgacgggtgtaacaacccctgagcccattggagccc
caagcctgggtgagttgtggcaactaccctccctcctacaactgaccttccactcctccagaacgctctcctacactgataaccaact
gagcggcgcatcccgttggagccacttctccagctgcttaggatgagcagctgtggaggcccttacgtaagcccaggggacattcaac
agccccactaccaggccactaccacccaacattgactgcacatggaaactgaggtgcccacaaccagcatgtgaaggctgcttcaattctt
ctacctgctggagcccggcgtgcttgcgggcactgccccaggactacgtggagaaatggggagaatactggggagaggtcccagttcg
tctcaccagcaacagcaacaagatcacagttccttcaactcagatcagctcctacaccgacaccggcttctagctgaatacctctctacgactca
gtgacctatgcccgggagttcacgtgccgacggggcgggtgtatccggaaaggagctgcctgtgtagctggccgactgcaccgaccacag
cgatgagctcaactgcaattgacgacccggccaccagttcaggtcaagaaacagttctcaagcccctcttctgggtctgacagatgtgaacgac
tgggagacaacagcagcagcaggggtgcaattgctggcccagacctcaggtgttccaatgggaagtgcctctcgaagggcagcagtgcaa
tgggaaggacgacttggggaggggtccgacgagggcctctgcccagggtgaagctgctcacttctacaaaacacacctaccgctgctcaatg
ggctctgcttggcaaggccaacctgagttgacgggaaggaggactgtagcagcggctcagatgagaaggactgcgactgtggctgctggte
attcacgagacaggctcgttgggtggggcacggatgcccgatgagggcgagttggcctggcaggtaaagcctgcatgctctggccagggccaca
tctgctgggtctccctcactctcccaactggctggtctgcccacactgctacatcagatgacagaggatcaggtaactcagaccccacgagtgga
cggccttctgggcttgcacgaccagagccagcagcagcccctgggtgacgagcgcaggtcaagcgcacatctcccacccccttctcaatg
acttacccttgaactatgacatcgcgctgctggagctggagaaaccggcagaglacagctccatgggtgcccacatgctgcccggagcctccca
tcttccctgcccgaaggccatctgggtcagggctggggacacaaccagatggaggcactggcgctgctgctgcaaaaagggtgagatcc
gctcacaaccagaccactgagaaacctctgcccagcagatcagccgcgatgtgctggtggcttctcagcggcggctggactcct
gcccagggtgatccgggggaccctgtccagcgtggaggcggatggcggalettcagccgggtggtgagctgggggagcggctgctgctca
gaggaacaagccagcgtgtacacaaggctccctctgttgggactggatcaaaagagaactgggtatag **(parada)**

Figura 1A

B

10 20 30 40 50 60
 MGSDRARKGG GGPKDFGAGL KYNSRHEKVN GLEEGVEFLP VNNVKKVEKH GPGRWVVLAA
70 80 90 100 110 120
 VLIGLLLVLL GIGFLVWHLQ YRDVRVQKVF NGYMRLITNEN FVDAYENSNS TEFVSLASKV
130 140 150 160 170 180
 KDALKLLYSG VPFLGPHYKE SAVTAFSEGS VIAYYWSEFS IPQHLVEEAE RVMAERVVM
190 200 210 220 230 240
 LPPRARSLSK FVVTSVVAFP TDSKTQRTQ DNSCSFGLHA RGVELMRFTT PGFPDSPYPA
250 260 270 280 290 300
 HARCQWALRG DADSVLSLTF RSFDLASCDE RGSDLVTVYN TLPMEPHAL VQLCGTYPPS
310 320 330 340 350 360
 YNLTFHSSQN VLLITLITNT ERRHPGFEAT FFQLPRMSSC GGRLRKAQGT FNSPYYPGHY
370 380 390 400 410 420
 PPNIDCTWNI EVPNNQHVKV RFKFFYLLEP GVPAGTCPKD YVEINGEKYC GERSQFVVTs
430 440 450 460 470 480
 NSNKITVRPH SDQSYTDTGF LAEYLSYDSS DPCPGQFTCR TGCIRKELR CDGWADCTDH
490 500 510 520 530 540
 SDELNCSCDA GHQFTCKNKF CKPLFWVCDs VNDCGDNSDE QGCSCPAQTF RCSNGKCLSK
550 560 570 580 590 600
 SQQCNGKDDC GDGSDEASCP KVVVVTCTKH TYRCLNGLCL SKGNPECDGK EDCSDGSDEK
610 620 630 640 650 660
 DCDCGLRSFT RQARVVGGTD ADEGEWPWQV SLHALGQGHl CGASLISPnW LVSAAHCYID
670 680 690 700 710 720
 DRGFRYSDPT QWTAFLGLHD QSQRSAPGVQ ERRLKRIISH PPFNDFTFDY DIALLELEKP
730 740 750 760 770 780
 AEYSSMVRPI CLPDASHVFP AGKAIWVTGW GHTQYGGTGA LILQKGEIRV INQTTcENLL
790 800 810 820 830 840
 PQQITPRMMC VGFLSGGVDS CQGDSGGPLS SVEADGRIFQ AGVVSWGDGC AQRNKPGVYT
850
 RLPLFRDWIK ENTGV

Figura 1B

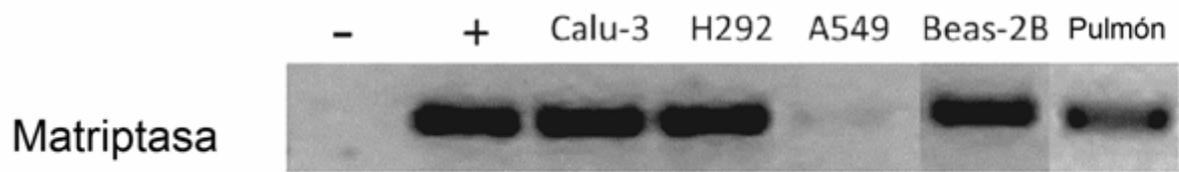


Figura 2

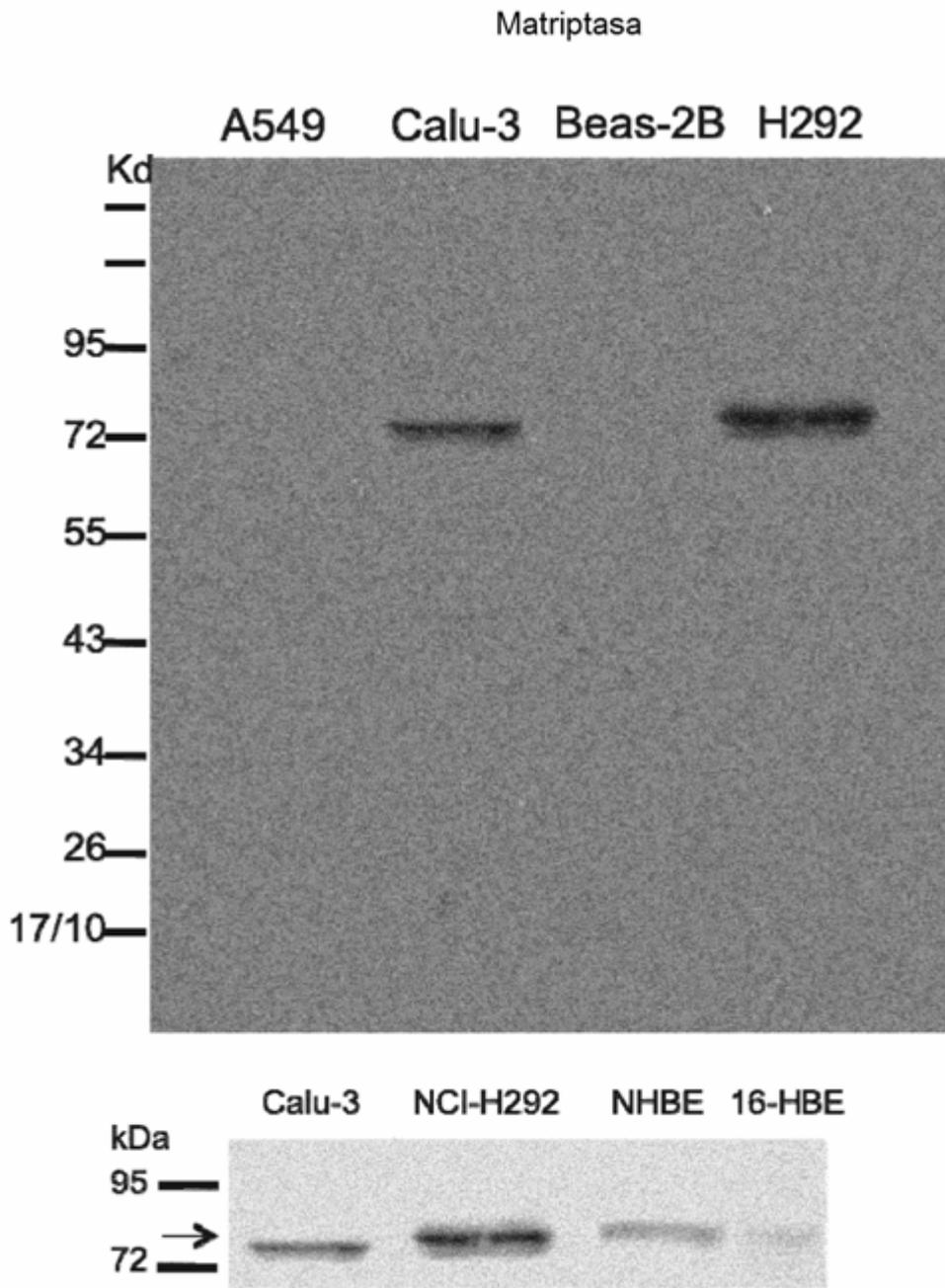


Figura 3

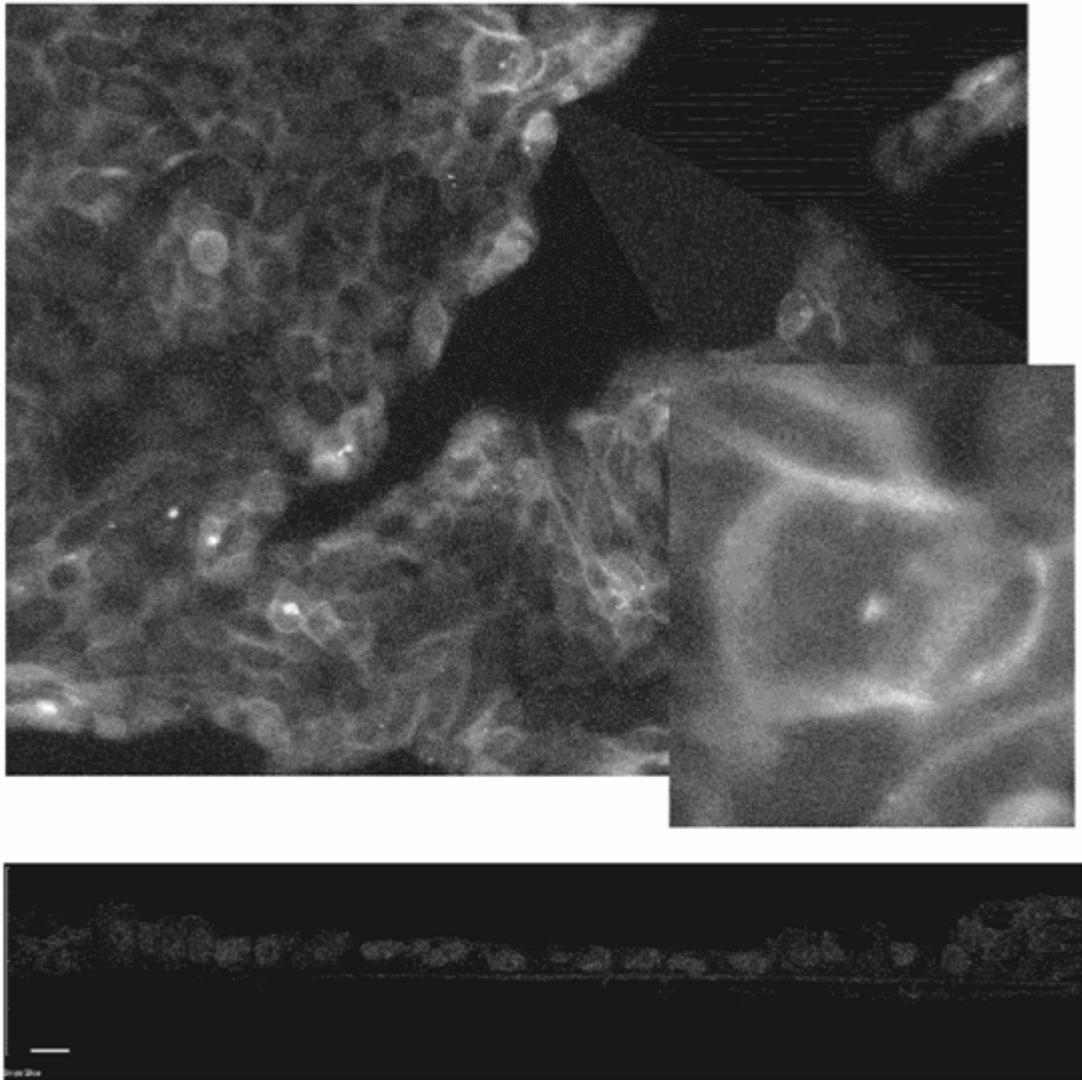
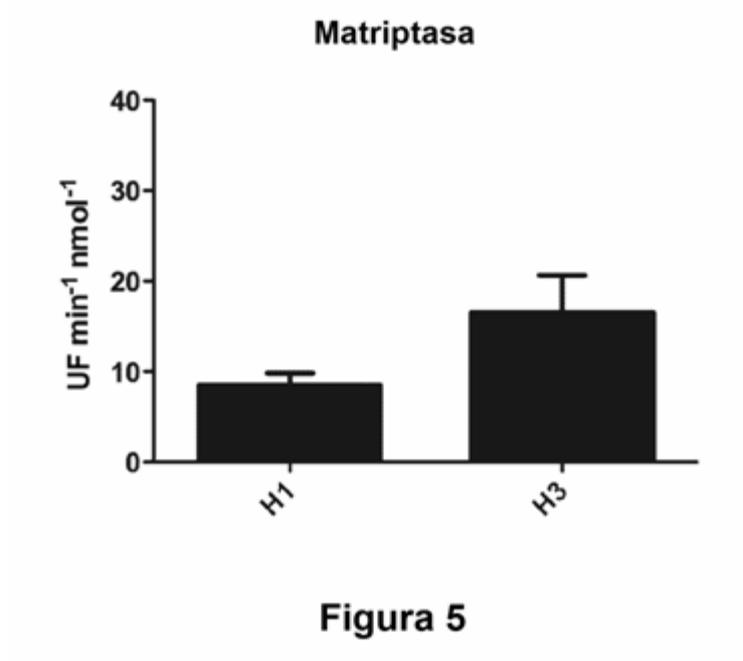


Figura 4



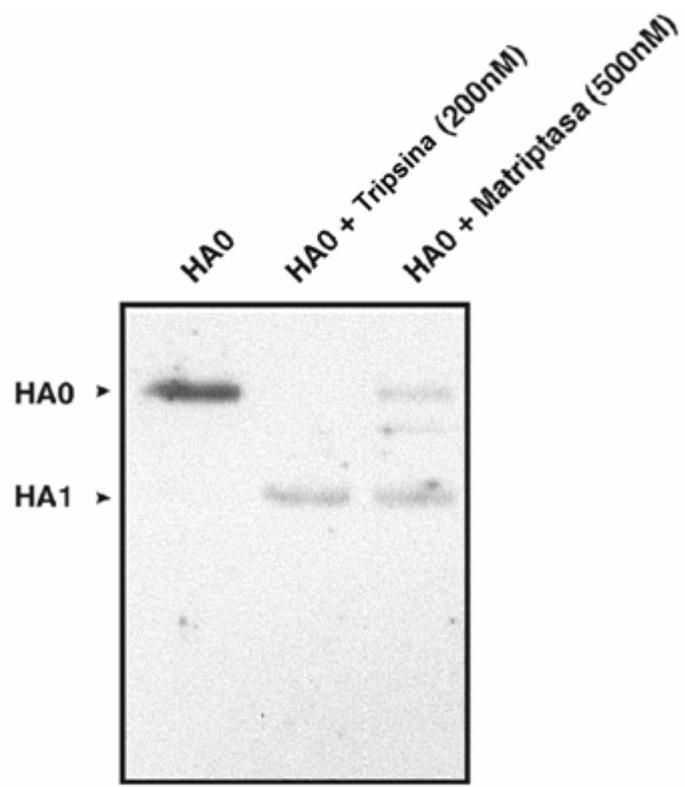


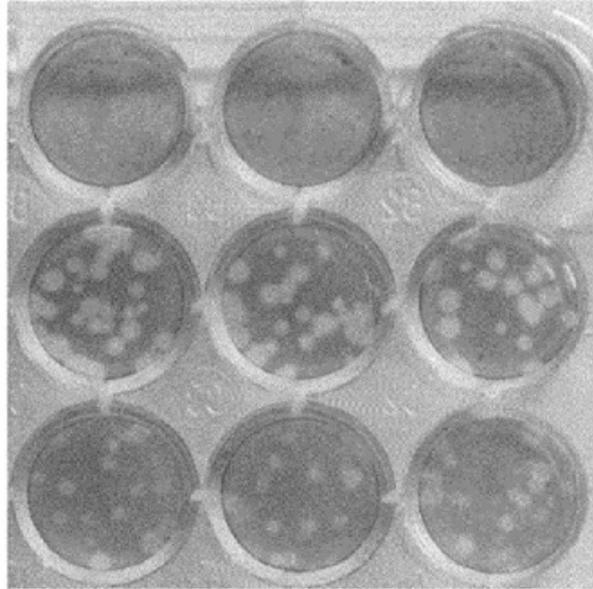
Figura 6

A

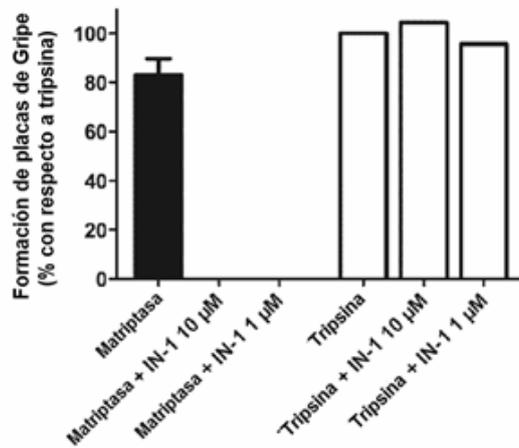
PR8, sin enzima

PR8 + tripsina

PR8 + matriptasa



B



C

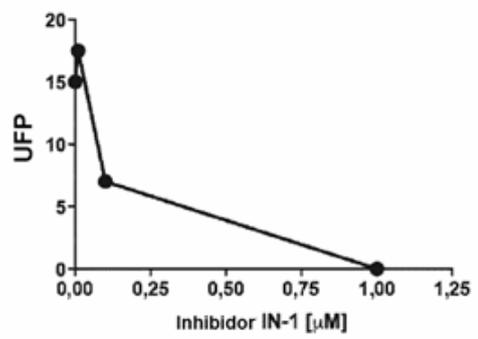
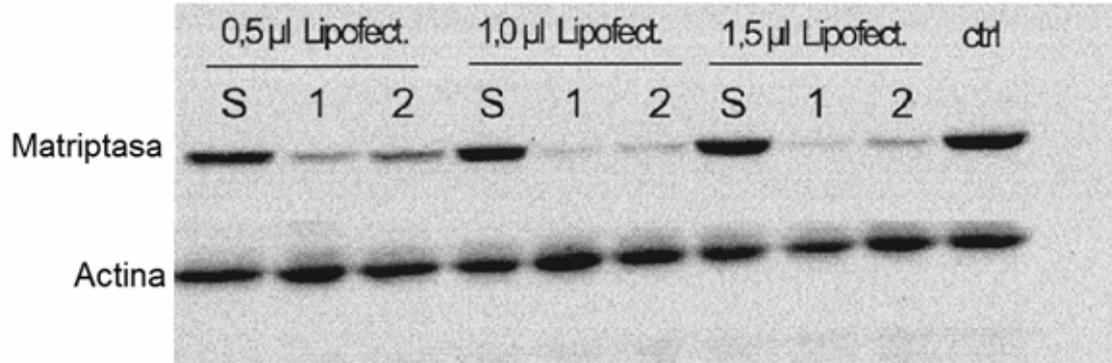


Figura 7

A



B

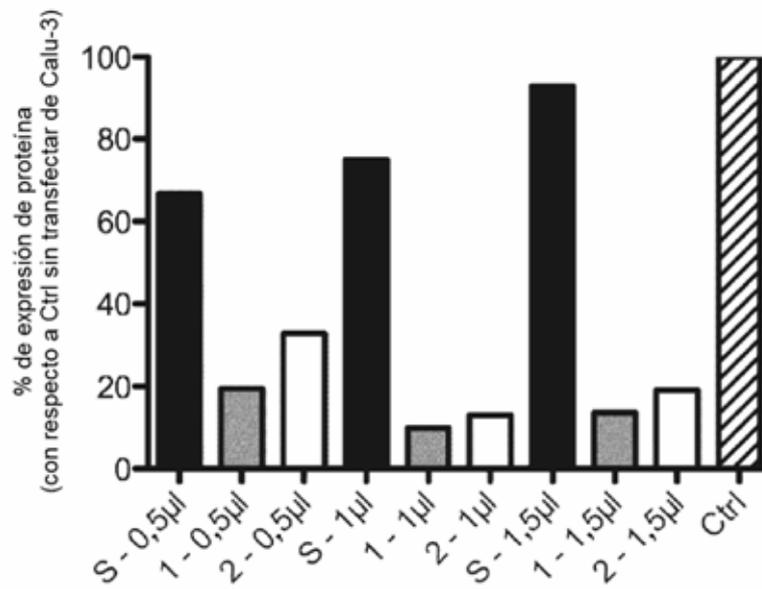


Figura 8

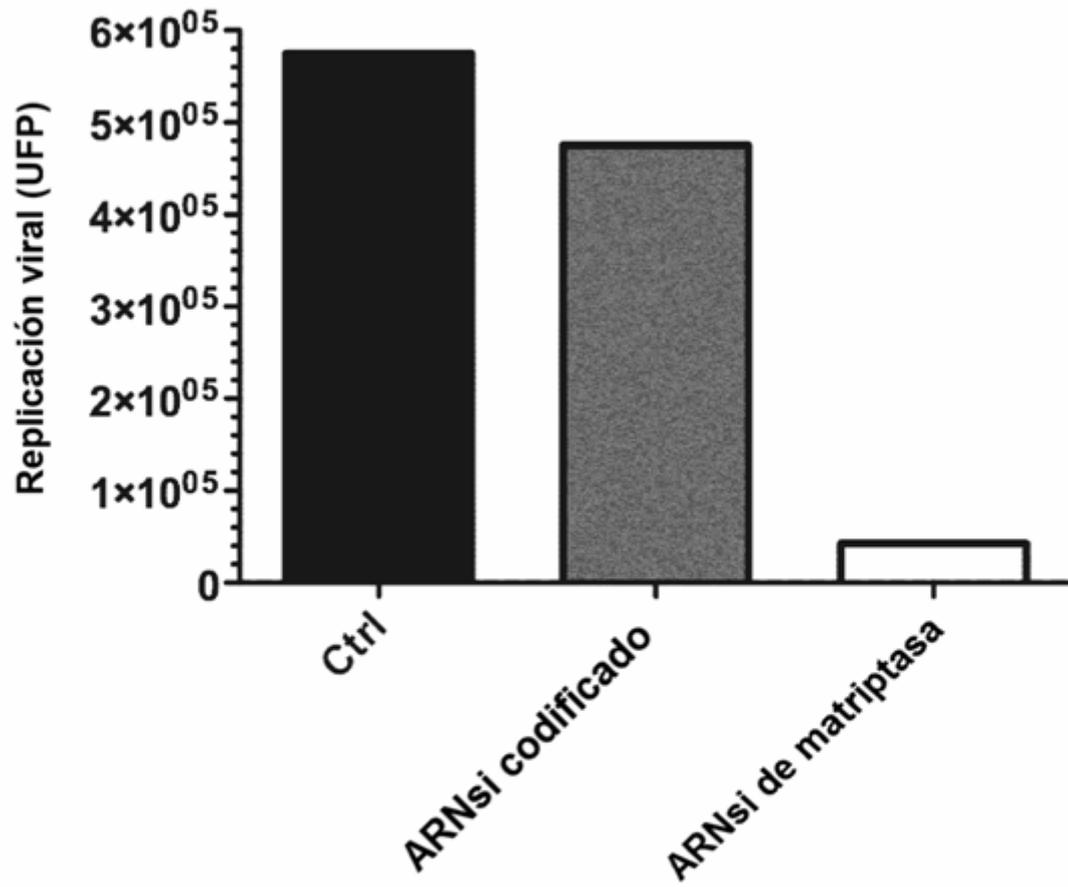


Figura 9

Matriptasa 1 nm con respecto a Benzotiazoles 1 μ M

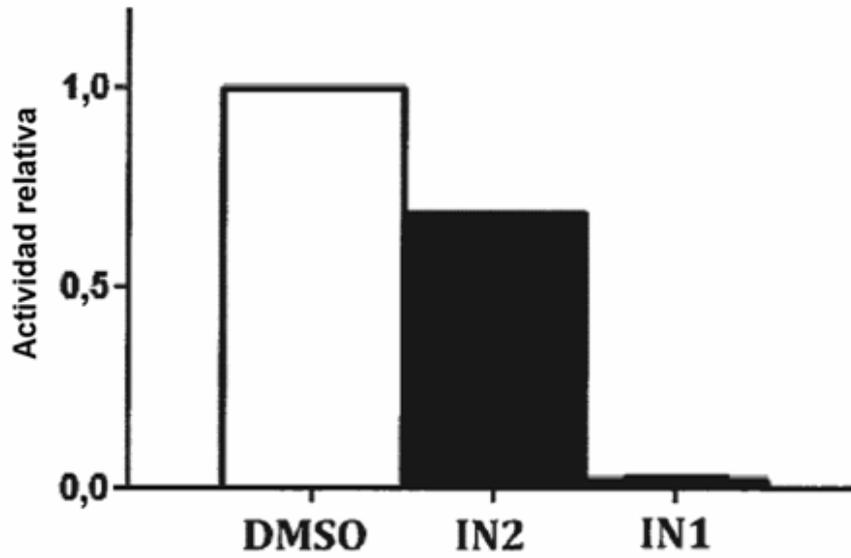


Figura 10

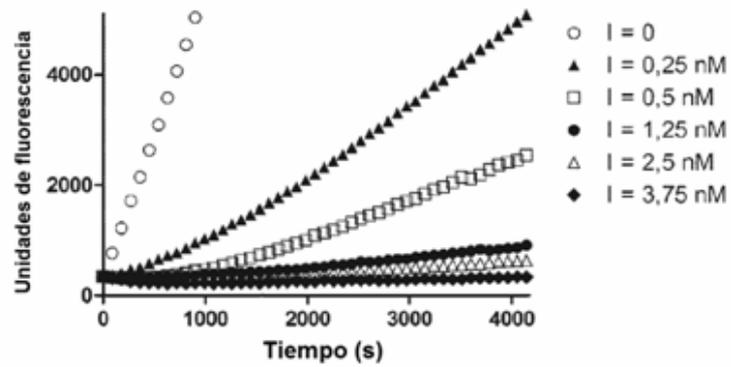


Figura 11A

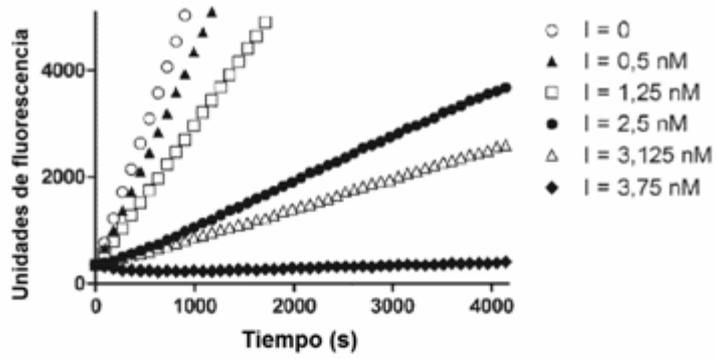


Figura 11B

IN1 en células HEK 293 transfectadas
(incubación 24)

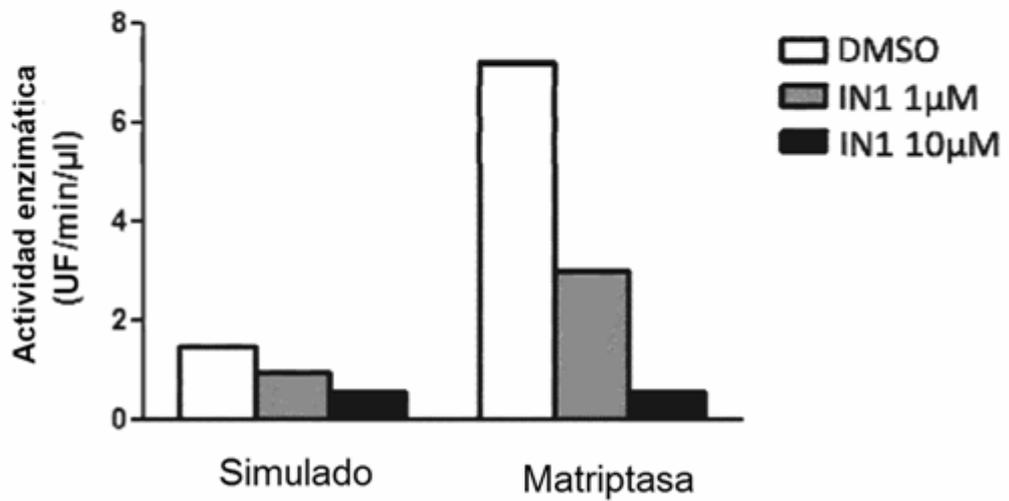


Figura 12

IN1 (1 μ M) respecto a proteasas (1 nM)

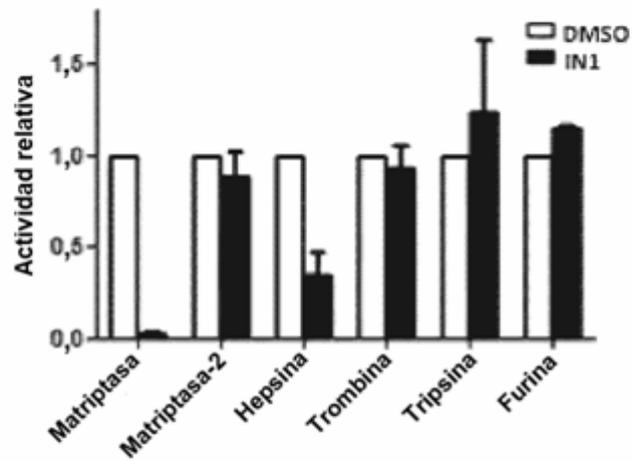


Figura 13A

Matrip 1nM - QAR-AMC 50 μ M
 Hepes 50 mM pH 7,4
 Compuesto IN1
 $CI_{50} = 29$ nM

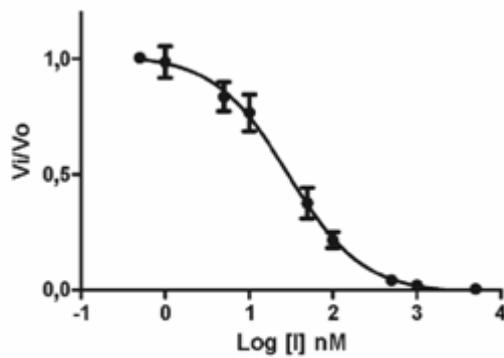


Figura 13B

Hepsina 1 nM - Boc-QAR-AMC 50 μ M
Hepes 50 mM pH 7,4
Compuesto IN1
 $CI_{50} = 540$ nM

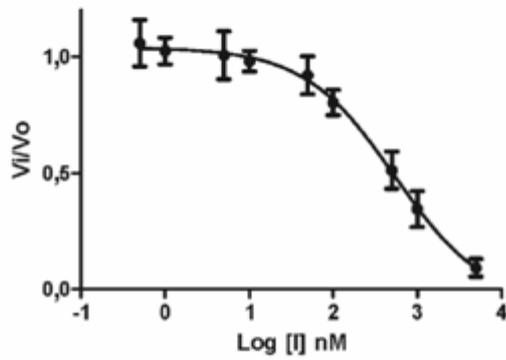


Figura 13C

PR8 + Matriptasa

IN-1 1 μ M

IN-1 10 μ M

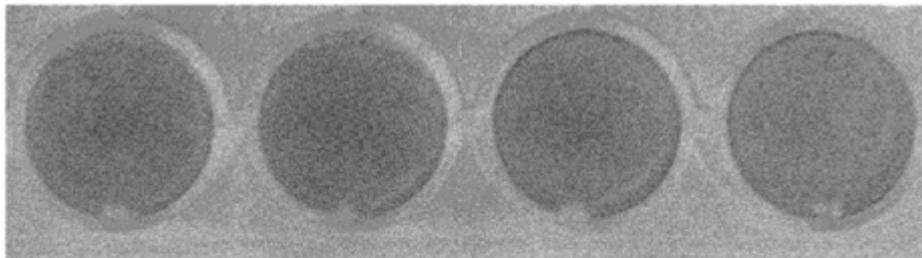


Figura 14

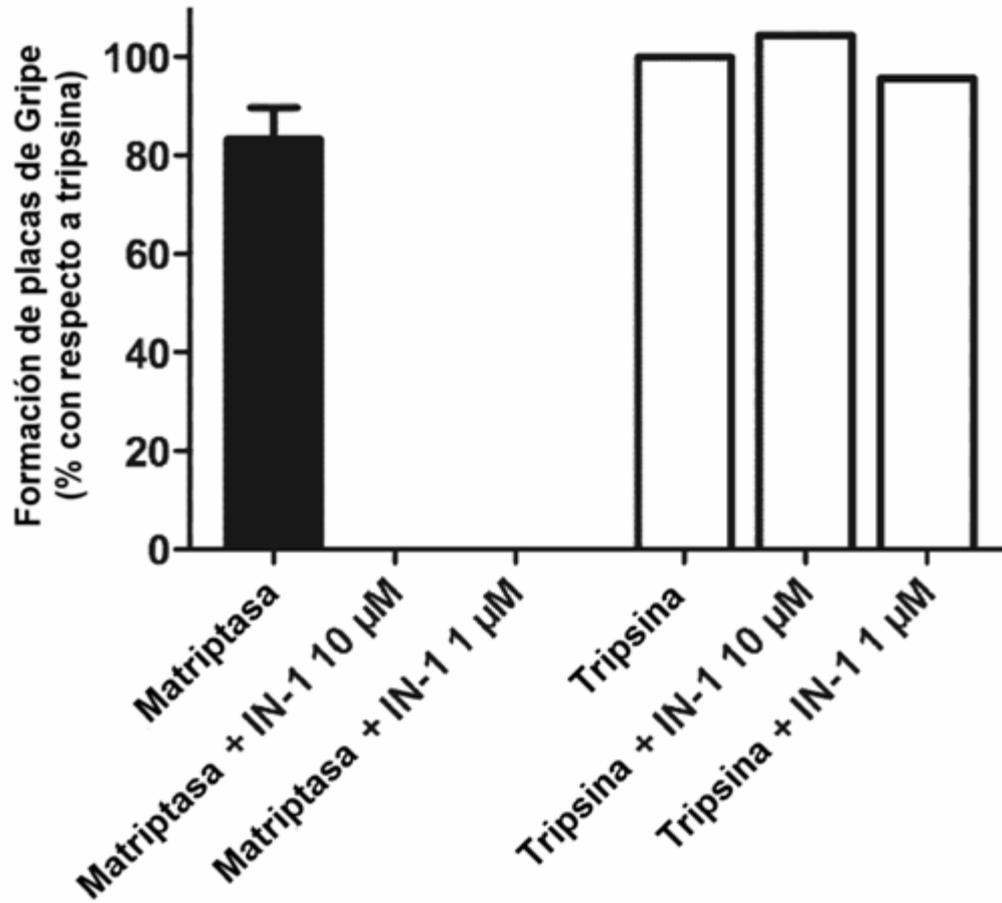
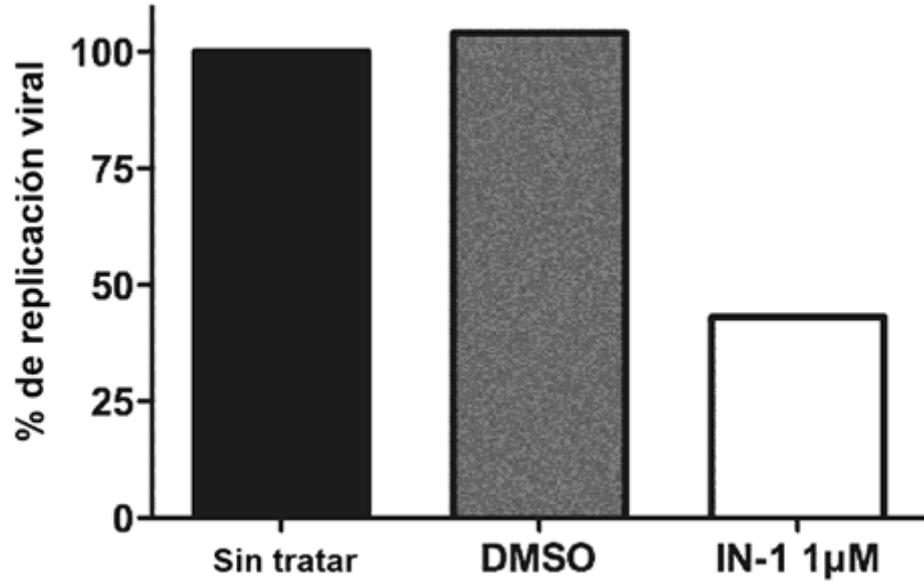


Figura 15



Curva de concentración-respuesta inhibitoria de IN-1 en células Calu-3

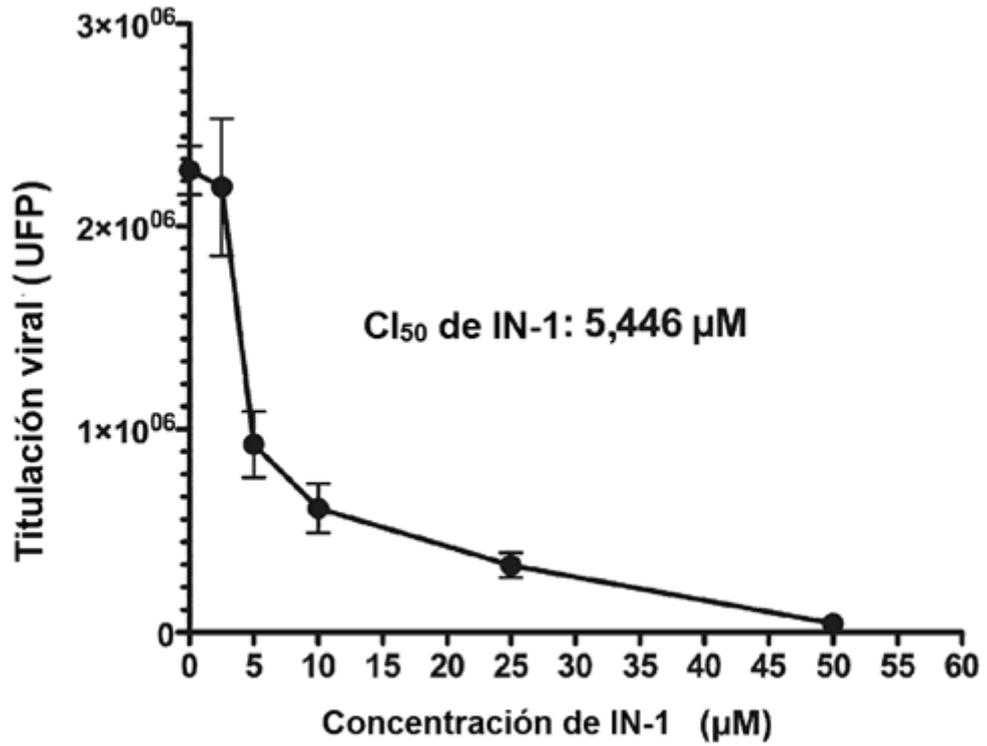


Figura 16

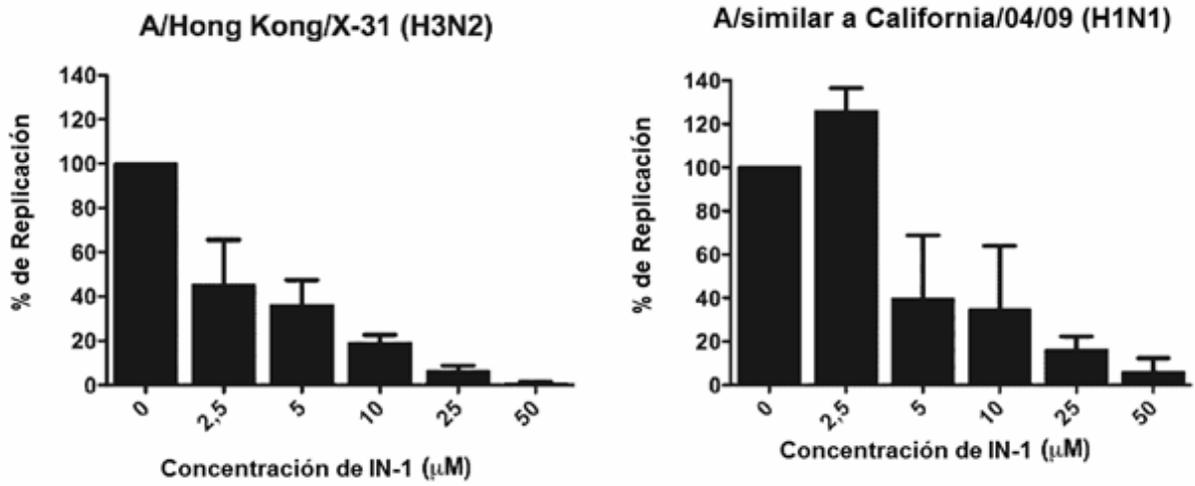


Figura 17

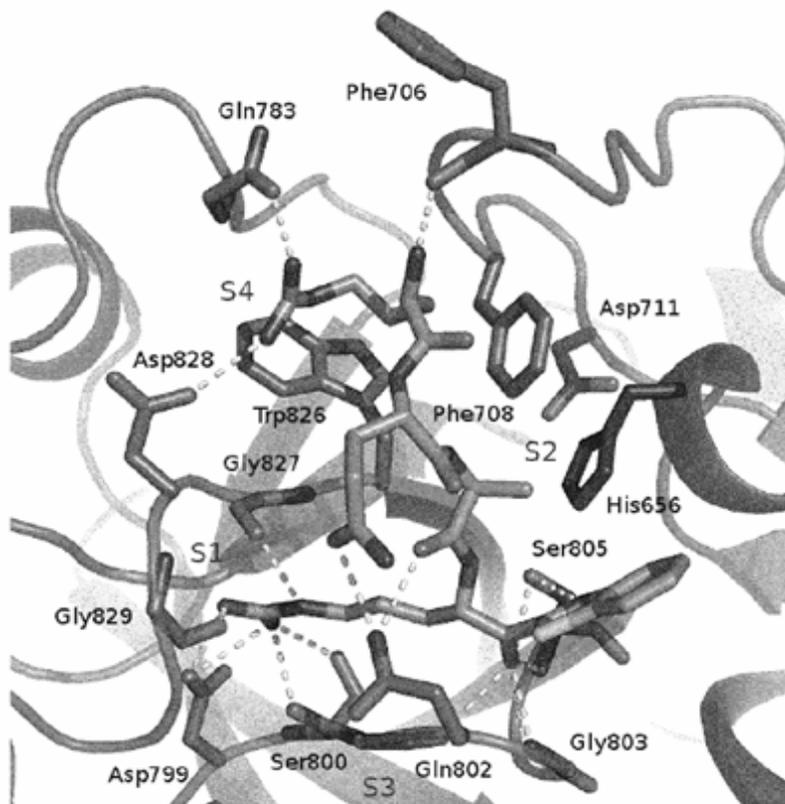


Figura 18