

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 680**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/7012 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2010 PCT/AU2010/000846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO11000053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010 E 10793441 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2448590**

54 Título: **Carbohidratos medicinales para el tratamiento de afecciones respiratorias**

30 Prioridad:

03.07.2009 AU 2009903123

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

17.04.2019

73 Titular/es:

**AUSTRALIAN BIOMEDICAL COMPANY PTY LTD
(100.0%)**

**34 Munro Avenue
Mt Waverley, Victoria 3149, AU**

72 Inventor/es:

**JIN, BETTY;
JONES, PAUL ARTHUR;
SEAH, EE LING;
WU, WEN YANG y
JENKINS, PETER JAMES**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 709 680 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

Carbohidratos medicinales para el tratamiento de afecciones respiratorias

Campo de la invención

5 Esta invención se relaciona con un nuevo método y un grupo de carbohidratos de Fórmula (1) y/o (2), y sus composiciones para tratar la tos y afecciones respiratorias relacionadas lo que incluye infecciones post víricas/bacterianas, bronquitis aguda/crónica, EPOC y afecciones inflamatorias.

Antecedentes de la invención

10 En los seres humanos, el tracto respiratorio, con un área de un campo de fútbol, es la superficie más grande que conecta el cuerpo con el mundo exterior, requerido para un intercambio de aire suficiente; mientras tanto, se ve afectado por muchas sustancias físicas, químicas y biológicas en el aire que causan trastornos que incluyen el asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, afecciones inflamatorias del pulmón y vías respiratorias. Además, algunos trastornos genéticos, tales como la fibrosis quística, se ven afectados por la conexión del tracto respiratorio con el mundo exterior. Los virus y las bacterias pueden entrar en el cuerpo y causar infecciones en el tracto respiratorio.

15 La tos es una de las afecciones comunes que deben tratarse. Sin embargo, los tratamientos actualmente disponibles solo están limitados al alivio de los síntomas, dejando que el cuerpo se recupere por sí solo y en muchos casos las recuperaciones son lentas.

En Australia, la venta de jarabe para la tos supera los 20 millones de dólares al año. Se estima que el mercado mundial de jarabe para la tos supera los mil millones de dólares por año.

20 La tos persistente, a veces con un período de normalidad que dura meses o incluso años, se atribuye al asma bronquial, al reflejo oculto o a las infecciones post víricas/bacterianas y al tabaquismo que hace que la vía aérea se vuelva hipersensible/hiperreactiva. Por consiguiente, existe la necesidad de un tratamiento eficiente que pueda ayudar al cuerpo a recuperarse después de haber sido afectado por muchas sustancias físicas, químicas y biológicas en el aire que pueden causar trastornos en el sistema respiratorio.

25 La discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos y similares se incluye en esta especificación únicamente con el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No se sugiere ni representa que alguno o todos de estos asuntos formen parte de la base de la técnica anterior o sean de conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención, tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

30 Compendio de la invención

La presente invención proporciona en un aspecto de la realización un método para promover la restauración de un sialilglicoconjugado sobre la superficie de una célula respiratoria dañada de un sujeto a fin de tratar una afección respiratoria en el sujeto, el método incluye la etapa de administrar al sujeto al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable capaz de acelerar la biosíntesis del sialilglicoconjugado.

35 En una realización divulgada, el método proporciona una recuperación de la viabilidad de la célula de tal manera que la célula esté en mejores condiciones para que la función biológica normal responda a factores que pueden afectar la superficie respiratoria, lo que conduce a afecciones respiratorias tales como, pero no limitadas a, la tos, infecciones víricas o bacterianas, bronquitis aguda/crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística y otras afecciones inflamatorias respiratorias.

40 En otra realización, la divulgación proporciona el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos de Fórmula (1) y Fórmula (2) y sus sales y derivados farmacéuticamente aceptables y combinaciones de los mismos. El uso es para el tratamiento o prevención de una afección respiratoria como se describe en este documento.

45 En otros aspectos de la invención, se proporcionan composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable capaz de acelerar la biosíntesis de sialilglicoconjugados para uso en el tratamiento y prevención de afecciones respiratorias.

Las realizaciones de la invención se especifican en las reivindicaciones.

También se describe en este documento un método de selección de un compuesto para el tratamiento de una afección respiratoria, dicho método comprende:

50 someter a una célula que tiene sialilglicoconjugados reducidos en una superficie de la célula a un compuesto de prueba; y

medir la recuperación de los sialilglicoconjugados en la superficie de la célula después de la exposición del compuesto de prueba a la célula.

La medición de la recuperación de los sialilglicoconjugados en la superficie de la célula se puede determinar mediante una medición de la viabilidad de la célula.

- 5 En otro aspecto más de la divulgación, se proporciona un método para tratar o prevenir una afección respiratoria en un sujeto, el método incluye la etapa de administrar al sujeto al menos un compuesto identificado por el método de selección.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la ruta de biosíntesis de los sialilglicoconjugados en células vivas.

10 **Descripción detallada de la invención**

Desde el punto de vista de la biología celular y de la biología molecular, la hipersensibilidad/hiperreactividad del tracto respiratorio dañado puede ser causada por su superficie celular dañada, que luego será susceptible a la estimulación de los agentes irritantes. Por ejemplo, los solicitantes han encontrado que las células del tracto respiratorio después de una infección vírica o bacteriana a menudo habían perdido los ácidos siálicos terminales en su superficie de sialilglicoconjugados. Como consecuencia, se redujo la viabilidad de la célula "desnuda". Esto provocó entonces una respuesta inflamatoria que llevó a la bronquitis y la tos. Sin estar limitados por la teoría, se postula que la restauración de los ácidos siálicos en la superficie celular puede reparar el tracto respiratorio dañado por una infección u otros factores físicos, químicos, biológicos, a fin de afectar eventualmente a la bronquitis y detener la tos.

20 Los solicitantes han mostrado en esta solicitud experimentos de cultivo celular realizados en dos líneas celulares del tracto respiratorio humano: células epiteliales de vías aéreas pequeñas (SAECs) y células epiteliales bronquiales/traqueales humanas normales (NHBEs). Las células fueron tratadas originalmente con neuraminidasas (NAs) de virus de influenza o bacterias. Las NAs escinden los ácidos siálicos de la superficie celular de los sialilglicoconjugados. Como consecuencia, se reduce la viabilidad de las células "desnudas". Por ejemplo, las SAECs perdieron más del 25% de viabilidad cuando se trataron con NA de *C. perfringens* a una concentración final de 0,01 U/ml, o con NA del virus de la influenza NWS/G70C a una concentración final de 0,17 µg/pocillo. También se obtuvieron resultados similares en la línea celular NHBE. Después de que las células se trataron con NA, las células se lavaron para eliminar la NA, y luego se incubaron con compuestos de Fórmula (1) y/o (2) durante 24 horas. Finalmente se determinaron las viabilidades celulares. Los resultados (ejemplos 7-36) mostraron que un grupo de carbohidratos de fórmula (1) y/o (2) podrían ayudar a recuperar la viabilidad de las células del tracto respiratorio dañadas al restaurar los sialilglicoconjugados en su superficie.

En consecuencia, la presente invención proporciona en un aspecto de la invención un método para promover la restauración de un sialilglicoconjugado en la superficie de una célula respiratoria dañada de un sujeto a fin de tratar una afección respiratoria en el sujeto, el método incluye la etapa de administrar al sujeto al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable capaz de acelerar la biosíntesis de los sialilglicoconjugados.

La presente divulgación proporciona en otro aspecto de la invención un método para promover la recuperación de la viabilidad celular de una célula respiratoria dañada de un sujeto a fin de tratar una afección respiratoria en el sujeto, el método incluye la etapa de administrar al sujeto al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable capaz de acelerar la biosíntesis de los sialilglicoconjugados.

40 La promoción de la restauración de los sialilglicoconjugados en la superficie de una célula respiratoria también puede indicar la recuperación de la célula a un estado viable o la recuperación de la viabilidad de modo que la célula esté en mejores condiciones para que la función biológica normal responda a factores que pueden afectar la superficie respiratoria, lo que conduce a afecciones respiratorias tales como la tos no limitada, infecciones post víricas o post bacterianas, bronquitis aguda/crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis cística y otras afecciones inflamatorias respiratorias.

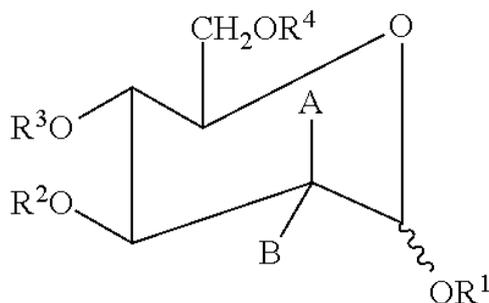
En otra realización, se selecciona al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable del grupo que consiste en carbohidratos capaces de participar como productos intermedios en la biosíntesis de sialilglicoconjugados, sus precursores y profármacos y sus sales y derivados farmacéuticamente aceptables y combinaciones de los mismos.

50 Los compuestos mencionados anteriormente se pueden usar por vía oral, por inhalación o administración por inyección para el tratamiento de las afecciones respiratorias seleccionadas del grupo que comprende la tos, infecciones post víricas o post bacterianas, bronquitis aguda/crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis cística y otras afecciones inflamatorias respiratorias.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta especificación, la palabra "comprende" y las variaciones de la palabra, como "que comprende" y "comprende", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

En otra realización, la presente invención proporciona el uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en;

compuestos de fórmula (1):



Fórmula (1)

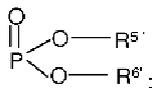
5

en donde,

B=H, y A es NHCOCH₃, NH₂, OH, NH₂HX, HX puede ser un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptable, tal como el ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, etc.

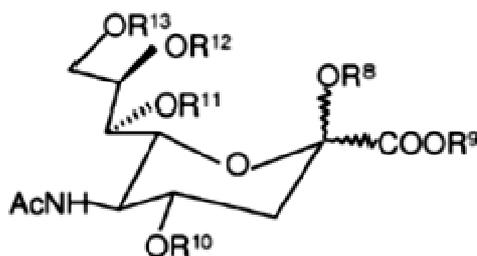
10 R¹, R², R³, R⁴ podrían ser iguales o diferentes. Podrían ser H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1~20), CH₂Fenilo, COCR⁵R⁶R⁷, ésteres activos de CO, tales como un éster de piva, éster de indenilo; R⁵, R⁶, R⁷ podrían ser iguales o diferentes. Podrían ser H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1~20), C₆H₅, CH₂Fenilo, CH₃CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m = 1~200); y,

R⁴ puede ser



15 R⁵, R⁶ podrían ser iguales o diferentes. Pueden ser H, o una sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable, tal como, Na, K, Ca, Mg, Zn, NH₃, trietilamina, etc., o R⁵, R⁶ podrían ser un éster farmacéuticamente aceptable, tal como (CH₂)_nCH₃ (n = 1~20) o CH₃CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m = 1~200) o un éster activo, tal como un éster de piva, éster de indenilo;

y compuestos de fórmula (2)



Fórmula (2)

20

En donde,

R⁸ podría ser H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1~20), CH₂Fenilo, COCH₂Fenilo, CO-éster activo, tal como un éster de piva, éster de indenilo, COCR¹⁴R¹⁵R¹⁶; en donde R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶ podrían ser iguales o diferentes. Podrían ser H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1~20), C₆H₅, CH₂Fenilo, CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m = 1~200);

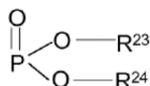
25 R⁸ puede ser citidina, monofosfato de citidina, difosfato de citidina, trifosfato de citidina, adenosina, monofosfato de adenosina, difosfato de adenosina, trifosfato de adenosina;

R⁹ puede ser H, CH₃, una sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable, tal como de Na, K, Ca, Mg, Zn, NH₃, trietilamina, etc., o un éster activo farmacéuticamente adecuado, tal como éster de piva, éster de indenilo etc., o CH₂CR¹⁷R¹⁸R¹⁹ en donde R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹ pueden ser iguales o diferentes. Podrían ser H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1~20),

$\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$ ($m = 1\sim 200$), C_6H_5 , CH_2Fenilo ;

R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} podrían ser iguales o diferentes. Podrían ser H, CH_3 , $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n = 1\sim 20$), CH_2Fenilo , un éster activo, tal como éster de piva, o $\text{COCR}^{20}\text{R}^{21}\text{R}^{22}$. R^{20} , en donde R^{21} , R^{22} podrían ser iguales o diferentes. Podrían ser H, CH_3 , $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n = 1\sim 20$), C_6H_5 , CH_2Fenilo , $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$ ($m = 1\sim 200$);

5 R^{13} puede ser



10 R^{23} , R^{24} podrían ser iguales o diferentes. Podrían ser H, CH_3 , $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n = 1\sim 20$), $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{CH}_3$ ($m = 1\sim 200$), CH_2Fenilo , o un éster activo, tal como un éster de piva, éster de indenilo o $\text{CH}_2\text{CR}^{25}\text{R}^{26}\text{R}^{27}$, o una sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable, tal como de Na, K, Ca, Mg, Zn, NH_3 , trietilamina, etc. y R^{25} , R^{26} , R^{27} pueden ser iguales o diferentes. Podrían ser H, CH_3 , $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n = 1\sim 20$), C_6H_5 , CH_2Fenilo .

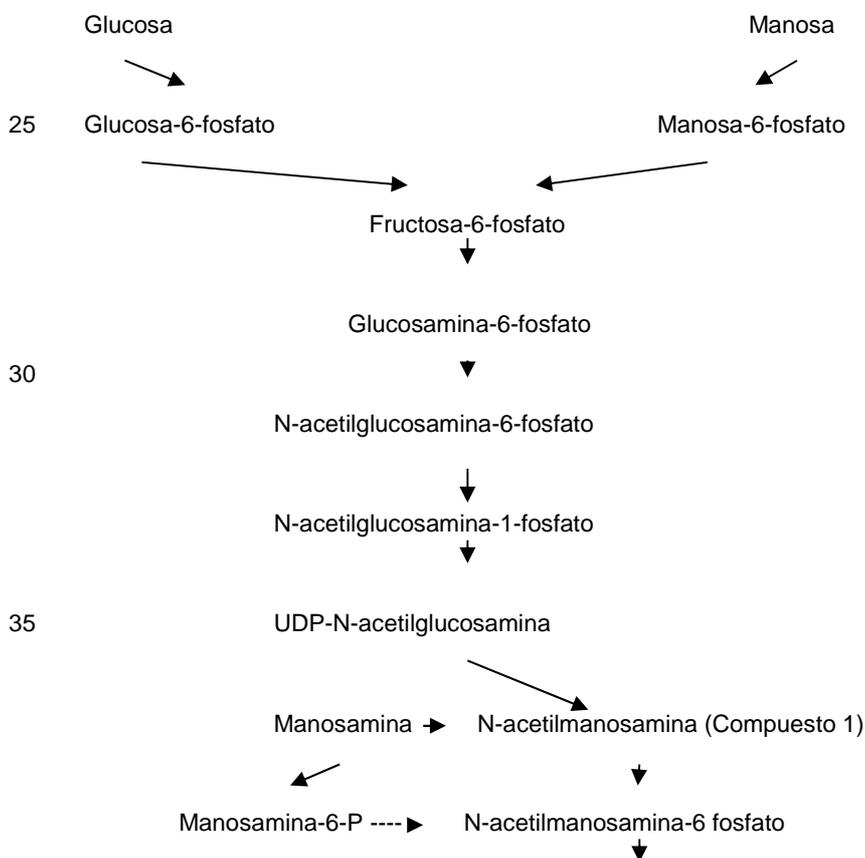
En una realización en la Fórmula (1) cuando $\text{A} = \text{NHCOCH}_3$, $\text{B} = \text{H}$, R^1 , R^2 , R^3 , $\text{R}^4 = \text{H}$, el compuesto es N-acetil-D-manosamina. Este se denominará Compuesto (1) a lo largo de esta especificación.

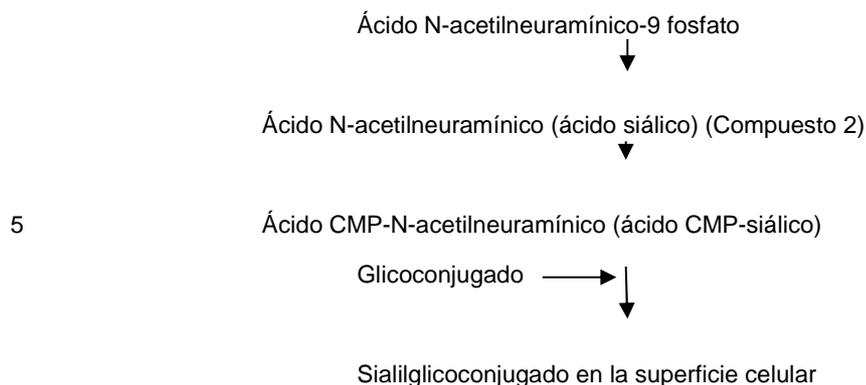
15 En otra realización en la Fórmula (2) cuando R^8 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , $\text{R}^{13} = \text{H}$, $\text{R}^9 = \text{Na}$, el compuesto es la sal sódica del ácido N-acetilneuramínico. (Sal sódica del ácido siálico). Esto se denominará Compuesto (2) a lo largo de esta especificación.

Cuando R^8 es el monofosfato de citidina (CMP) y R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , $\text{R}^{13} = \text{H}$, el compuesto es el ácido CMP-siálico.

20 Los ácidos siálicos como azúcares terminales en las cadenas de oligosacáridos del glicoconjugado en la superficie de la célula son bien adecuados como determinantes moleculares de procesos biológicos específicos tales como la adhesión celular^[1], la formación o el enmascaramiento de los determinantes de reconocimiento^{[2][3]} y la estabilización de la estructura de las glicoproteínas^[4]. La ruta de biosíntesis de los sialilglicoconjugados en células vivas se muestra a continuación en la Figura 1 ^[5].

Figura 1 - Ruta de biosíntesis de los sialilglicoconjugados en las células vivas





10 Se ha informado de que el ácido N-acetilneuramínico, pero no la lactosa, protegió de forma dependiente de la dosis del deterioro del transporte mucociliar^[6]. Además, el tratamiento previo con administraciones repetidas (inhalaciones) de ácido N-acetilneuramínico evitó notablemente los cambios inflamatorios causados por la exposición prolongada de SO₂ en los conejos^[7]. También se informó de que después de la administración oral, N-acetil-D-manosamina se metabolizó rápidamente en glucosa en los mamíferos^[8]. También se ha informado sobre métodos de administración de N-acetilmanosamina o su derivado (para producir ácido siálico en pacientes con deficiencia de la molécula de

15 azúcar) para el tratamiento de la atrofia muscular, incluida la miopatía hereditaria de cuerpos de inclusión (HIMB) y la miopatía distal con vacuolas de borde (miopatía de Nonaka)). Ciertas afecciones renales, como las derivadas de la hiposialización de las membranas renales, también pueden tratarse con este método^[8b] ^[8c].

Sin embargo, ninguno de estos tratamientos se relaciona con el uso de estos intermedios para el tratamiento de afecciones respiratorias.

20 Los compuestos de Fórmula (1) y/o (2) han sido sometidos a pruebas de seguridad por los solicitantes. Por ejemplo, los Compuestos (1) y (2) se usaron en un estudio de tolerancia y toxicidad subcrónica en ratones Balb-C (Código de aprobación AEC: BAM / B / 2005/16). Los resultados del estudio de tolerancia mostraron que ambos compuestos a 5 g/kg para dosis orales o 2 g/kg para dosis intraperitoneales fueron bien tolerados. En el estudio de toxicidad subcrónica, los resultados mostraron que ambos compuestos a 1 g/kg/día x 30 días para la dosis oral o 0,5 g/kg/día x 30 días para la dosis intraperitoneal no eran tóxicos.

Los solicitantes también establecieron un modelo de tos en cobayas. Los Compuestos (1) y (2) se probaron en este modelo. A una dosis oral de 500 mg/kg/día X 3 días, ambos compuestos pudieron restaurar los daños en el tracto respiratorio causados por la neuraminidasa en los cobayas. Estos resultados *in vivo* están en línea con los datos *in vitro*. Por lo tanto, tanto los datos de eficacia como de seguridad respaldan que los compuestos de fórmula (1) y/o (2) y, en particular, los Compuestos (1) y (2) pueden ser útiles para aplicaciones medicinales.

Los solicitantes han descubierto que los compuestos de fórmula (1) y/o (2) pudieron acelerar la recuperación de la viabilidad de las células del tracto respiratorio dañadas mediante la restauración de los sialilglicoconjugados en su superficie.

35 Los compuestos de fórmula (1) y/o (2) mejoran la producción de sialilglicoconjugados después de entrar en las células. Por lo tanto, un aspecto de esta invención se refiere al uso de compuestos de Fórmula (1) y/o (2), y sus sales y derivados farmacéuticamente aceptables y combinaciones de los mismos, o sus mezclas como agentes terapéuticos activos para el tratamiento de la tos, y afecciones respiratorias relacionadas incluyendo las infecciones post víricas/bacterianas, bronquitis aguda/crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística y afecciones inflamatorias.

40 Composiciones farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (1) y/o (2) y sus mezclas también pueden formarse combinándolos con uno o más ingredientes activos para el tratamiento de afecciones respiratorias. Por ejemplo, teofilinato de colina (broncodilatador), teofilina (broncodilatador), salbutamol y sulfato de terbutalina (alivio del broncoespasmo asociado con el asma y otras afecciones respiratorias), bromhexina (expectorante, mucolítica), codeína, folcodina (analgésico, antitusivo), clofedanol (antitusivo), pentoxiverina (antitusivo), dimetoxanato, glaucina (antitusivo), promdato, taloximina, acetil piperacetamida, aceite de eucalipto, cloruro de amonio y hierbas como la *fritillaria cirrhosa* (hierba anti-tos). Inhibidores de la síntesis de mucina tales como el talniflumato, los ácidos 2-amino-fenilacéticos, o la combinación con algunos glucocorticoides como la flunisolida (antiasmática), o la combinación con alivio de los síntomas de jarabes para la tos farmacéuticamente compatibles, o la combinación con un inhibidor de la fosfodiesterasa-4, tal como el cilomilast (Ariflo) para el tratamiento de la

45 enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

Además, las composiciones farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (1) y/o (2) y sus sales y derivados farmacéuticamente aceptables y combinaciones de los mismos, y sus mezclas también pueden formarse combinándolos con uno o más ingredientes activos, por ejemplo, agentes antivíricos tales como zanamivir y/o oseltamivir (agentes anti-virus de la influenza), pleconaril y/o enviroxima (agentes anti-rhinovirus), agentes

antimicrobianos, tales como los antibióticos, por ejemplo, las eritromicinas, tetraciclinas, rifamicinas, penicilinas, cefalosporinas; quinolonas, fluoroquinolonas; sulfonamidas y trimetoprimas; agentes antifúngicos, tales como, las anfotericinas, clotrimazol, econazol, fluconazol, flucitosina, etc.

5 Las referencias a los compuestos de fórmula (1) y/o (2) en este documento incluyen los compuestos de fórmula (1) y/o (2), y sus derivados y sales de los mismos farmacéuticamente aceptables.

En una realización adicional o alternativa, se proporciona un método para el tratamiento o prevención de afecciones respiratorias que incluyen infecciones post víricas/bacterianas, bronquitis aguda/crónica, EPOC, fibrosis quística y afecciones inflamatorias en animales que incluyen seres humanos que comprende la administración de una cantidad eficaz de compuestos de fórmula (1) y/o (2).

10 También se proporciona en un aspecto adicional o alternativo el uso de los compuestos de fórmula (1) y/o (2) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de afecciones respiratorias que incluyen infecciones post víricas/bacterianas, bronquitis aguda/crónica, EPOC, fibrosis quística y afecciones inflamatorias en animales, incluidos seres humanos.

15 La cantidad de los compuestos de Fórmula (1) y/o (2) requerida para el uso en el tratamiento variará con la vía de administración, la naturaleza de la afección que se está tratando y la edad y condición del animal (incluidos los pacientes humanos), y, en última instancia, será a discreción del veterinario o médico asistente.

En general, una dosis adecuada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a 500 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente en el intervalo de 0,1 mg a 50 mg/kg/día.

20 En general, la dosis para la administración oral sería de 1 mg/kg/día a 500 mg/kg/día, la dosis inyectable sería de 1 mg/kg/día a 100 mg/kg/día. La dosis para inhalación sería de 0,01 mg/kg/día a 5 mg/kg/día. Preferiblemente, la dosis sería de 5 mg a 50 mg/kg para administración oral o por inyección, de dos a tres veces al día durante 5 a 10 días; la dosis sería de 0,1 a 0,5 mg/kg para inhalación, de una a cinco veces al día durante un período de 5 a 10 días.

25 El tratamiento se inicia preferiblemente después o en el momento en que se produce la tos o afecciones relacionadas y continúa hasta que cesa la tos o afecciones relacionadas. El tratamiento adecuado se administra de 1 a 4 veces al día y se continúa durante de 3 a 30 días.

La dosis deseada puede presentarse en una dosis única o en dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis por día.

30 Los compuestos de fórmula (1) y/o (2) se administran convenientemente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, que contiene de 0,1 a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Tal como se usa en este documento, el término "dosis unitaria" incluye no solo dosis unitarias envasadas individualmente, tales como viales, sino también partes alícuotas dispensadas de viales a jeringas y composiciones para infusión contenidas en contenedores de infusión.

Si bien es posible que, para uso en terapia, los compuestos de fórmula (1) y/o (2) puedan administrarse como el producto químico en bruto, es preferible presentar el ingrediente activo como una formulación farmacéutica.

35 La invención proporciona además una formulación farmacéutica que incluye los compuestos de fórmula (1) y/o (2) o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables de los mismos y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. El (los) portador(es) deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos.

40 Las formulaciones farmacéuticas incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo intramuscular, intradérmica, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para la administración en el tracto gastrointestinal, o en una forma adecuada para la administración en el tracto respiratorio, (incluyendo las fosas nasales), por ejemplo, por inhalación o insuflación o por implantación intradérmica o subcutánea o por parche transdérmico. Las formulaciones pueden, cuando sea apropiado, presentarse convenientemente en unidades de dosificación discretas y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el compuesto activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y luego, si es necesario, conformar el producto en la formulación deseada.

45 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución, una suspensión o como una emulsión. El ingrediente activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta. Los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes, rellenos, lubricantes, disgregantes o agentes humectantes. Los comprimidos pueden recubrirse según métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como un producto seco para la

reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos (que pueden incluir aceites comestibles) o conservantes.

5 Los compuestos de fórmula (1) y/o (2) también pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, por ejemplo, inyección en bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de volumen pequeño o en recipientes de dosis múltiples con un conservante agregado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones con vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido por
10 aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de la solución, para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

Para la administración rectal, se prefieren los supositorios de dosis unitaria en donde el vehículo es un sólido. Vehículos adecuados incluyen la manteca de cacao y otros materiales comúnmente usados en la técnica, y los supositorios pueden formarse convenientemente mediante la mezcla del compuesto activo con el (los) vehículo(s)
15 ablandado(s) o fundido(s) seguido de enfriamiento y conformación en moldes.

Para la administración al tracto respiratorio (incluyendo la administración intranasal), los compuestos de fórmula (1) y/o (2) pueden administrarse por cualquiera de los métodos y formulaciones empleados en la técnica para la administración al tracto respiratorio.

Así, en general, los compuestos de fórmula (1) y/o (2) se pueden administrar en forma de una solución o una
20 suspensión o como un polvo seco.

Las soluciones y suspensiones serán preferiblemente acuosas, por ejemplo, preparadas a partir de agua sola (por ejemplo, agua estéril o libre de pirógenos) o agua y un disolvente conjunto fisiológicamente aceptable (por ejemplo, etanol, propilenglicol, polietilenglicoles, tales como PEG 400).

25 Dichas soluciones o suspensiones pueden contener además otros excipientes, por ejemplo, conservantes (tales como el cloruro de benzalconio), agentes solubilizantes/tensioactivos, tales como polisorbatos (por ejemplo, Tween® 80, Span® 80, cloruro de benzalconio), tampones, agentes de ajuste de la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio), potenciadores de la absorción y potenciadores de la viscosidad. Las suspensiones pueden contener adicionalmente agentes de suspensión (por ejemplo, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica).

30 Las soluciones o suspensiones se aplican directamente a la cavidad nasal por medios convencionales, por ejemplo, con un gotero, pipeta o aerosol. Las formulaciones se pueden proporcionar en forma única o multidosis. En este último caso, deseablemente se proporciona un medio de medición de dosis. En el caso de un gotero o pipeta, esto puede lograrse si el paciente administra un volumen apropiado y predeterminado de la solución o suspensión. En el caso de una pulverización, esto puede lograrse, por ejemplo, por medio de una bomba de pulverización atomizadora dosificadora.

35 También se puede usar una formulación de aerosol para la administración al tracto respiratorio, en la que los compuestos de fórmula (1) y/o (2) se proporcionan en un paquete presurizado con un propelente adecuado tal como un clorofluorocarbono (CFC), por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol también puede contener convenientemente un agente tensioactivo tal como la lecitina. La dosis de fármaco puede controlarse mediante la provisión de una válvula
40 dosificada.

Alternativamente, los compuestos de fórmula (1) y/o (2) se pueden proporcionar en forma de polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del compuesto en una base en polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados de almidón tales como hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidina (PVP). Convenientemente, el portador de polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición de polvo se puede presentar en forma de dosis unitaria, por
45 ejemplo, en cápsulas o cartuchos de, por ejemplo, gelatina o envases tipo blíster a partir de los cuales se puede administrar el polvo por medio de un inhalador.

En formulaciones destinadas a la administración al tracto respiratorio, incluidas las formulaciones intranasales, el compuesto generalmente tendrá un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, del orden de 5 micras o menos. Dicho tamaño de partícula se puede obtener por medios conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la
50 micronización.

Cuando se desee, pueden emplearse formulaciones adaptadas para proporcionar una liberación sostenida del ingrediente activo.

55 Los compuestos de fórmula (1) y/o (2) también se pueden usar en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes antiinfecciosos, tales como antibióticos, agentes antivíricos y agentes para el tratamiento de afecciones respiratorias. La invención proporciona así en un aspecto adicional una combinación que comprende los compuestos de fórmula (1) y/o (2) o un derivado farmacéuticamente aceptable de los mismos junto con otro agente

terapéuticamente activo.

Las combinaciones mencionadas anteriormente pueden presentarse convenientemente para uso en forma de una formulación farmacéutica y, así, tales formulaciones que comprenden una combinación como se define anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por lo tanto, comprenden un aspecto adicional de la invención.

Los componentes individuales de tales combinaciones pueden administrarse tanto secuencialmente como simultáneamente en formulaciones farmacéuticas separadas o combinadas.

Cuando los compuestos de fórmula (1) y/o (2) se usan con un segundo agente terapéutico activo en terapia, la dosis de cada compuesto puede ser la misma o diferir de la empleada cuando cada compuesto se usa solo. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente las dosis apropiadas.

Los compuestos de fórmula (1) y/o (2) y sus derivados farmacéuticamente aceptables pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica para la preparación de compuestos de estructura análoga.

La presente descripción también divulga un método de selección de un compuesto para el tratamiento de una afección respiratoria, comprendiendo dicho método:

someter una célula que tiene sialilglicoconjugados reducidos en la superficie de la célula a un compuesto de prueba; y medir la recuperación de la viabilidad de la célula después de la exposición del compuesto de prueba a la célula.

Basándose en la presente invención, se pueden usar otros compuestos para promover la restauración de sialilglicoconjugados en la superficie de una célula respiratoria; o para promover la recuperación de la viabilidad de la célula en cuanto a su capacidad para acelerar la biosíntesis de los sialilglicoconjugados. Por lo tanto, puede lograrse la restauración de las células a una mejor condición para que la función biológica normal responda a los factores que pueden afectar la superficie respiratoria, lo que lleva a afecciones respiratorias, siempre que los sialilglicoconjugados sean restaurados en la superficie de la célula.

Este método implica obtener una célula, preferiblemente una célula respiratoria que tiene los sialilglicoconjugados en la superficie reducidos. Esta célula se denomina "célula desnuda" y es vulnerable a factores que pueden afectar su capacidad para funcionar normalmente.

La célula puede derivarse sometiéndola a una célula normal, tal como una célula respiratoria, a una neuraminidasa para eliminar el ácido siálico de los sialilglicoconjugados en la superficie de la célula. Esta célula se mide luego en cuanto a la capacidad de un compuesto de prueba para restaurar los sialilglicoconjugados en su superficie. El compuesto de prueba puede restaurar los sialilglicoconjugados acelerando la biosíntesis de los sialilglicoconjugados o por otros medios que resulten en la restauración de los sialilglicoconjugados en la superficie de la célula.

La capacidad para restaurar los sialilglicoconjugados en la superficie de las células puede medirse mediante la restauración de la viabilidad de la célula. La viabilidad de la célula puede medirse por cualquier medio disponible para el destinatario experto. Sin embargo, se puede determinar por la capacidad de las células para la proliferación celular. Esto se puede medir por el uso de kits de proliferación celular estándar, tales como, pero no limitado a Cell Proliferation Elisa kit que mide BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) incorporada en el ADN recién sintetizado de células en replicación o por el uso de ensayos de proliferación celular basado en [³H]-timidina.

La capacidad también puede medirse determinando el número de sialilglicoconjugados restaurados en la célula como consecuencia de la exposición de la célula al compuesto de prueba. Esto puede medirse por medios disponibles para el experto en la técnica, tales como, pero sin limitarse al uso de anticuerpos a los sialilglicoconjugados.

En otra realización adicional, se proporciona un método para tratar o prevenir una afección respiratoria en un sujeto, el método incluye la etapa de administrar al sujeto al menos un compuesto identificado por el método de selección.

Finalmente, la invención como se describe en este documento anteriormente es susceptible de variaciones, modificaciones y/o adiciones distintas de las descritas específicamente y se entiende que la invención incluye todas estas variaciones, modificaciones y/o adiciones que se puedan realizar, se debe entender que varias otras modificaciones y/o adiciones caen dentro del alcance de la descripción como se indica aquí anteriormente. Los siguientes ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como una limitación de la invención.

Ejemplos

Métodos generales utilizados en los ejemplos.

- La RMN se grabó en un Bruker Avance 300, Xwin-NMR versión 3.5 en DPX 300A.
- La EM se registró en el espectrómetro de masas Waters Micromass ZMD utilizando un ESI (sonda de ionización

ES 2 709 680 T3

por electropulverización). El sistema se ejecutó utilizando el software Water Mass Lynx NT.

- La cromatografía ultrarrápida en columna se realizó en gel de sílice 60 F₂₄₅ (E. Merck).
- Se realizó una cromatografía de capa fina (CCF) en placas precubiertas de gel de sílice (E. Merck).
- HPLC se ejecutó en el módulo de separación de Waters alliance 2690, detectado por el detector de Waters UV de longitud de onda dual 2487, el software fue Waters Millenium 32.
- Ensayo de cultivo celular y viabilidad celular.

Método 1

Células utilizadas: células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas (SAECs)

Medio: kit de SAGM Bullet (suplemento de crecimiento + SABM)

10 Y/o

Células utilizadas: células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBEs)

Medio: kit BEGM Bullet (suplemento de crecimiento + BEBM)

Detalles experimentales:

15 Células crioconservadas (células 1x10⁶ en 1 ml) se descongelaron y se cultivaron en una placa de Petri de 175 cm² en medio completo. Los medios se retiraron al día siguiente y se reemplazaron con medios nuevos. Las células se cultivaron durante aproximadamente 5-6 días para obtener una confluencia del 70-80%. Durante la fase de crecimiento, los medios se cambiaron cada dos días.

20 Cuando se obtuvo la confluencia apropiada, se eliminó el medio. La monocapa de células se lavó con 1x PBS. Tras la eliminación del PBS, se agregaron 2 ml de tripsina+EDTA. Las células se agitaron suavemente a temperatura ambiente durante 2 minutos. Las células se recogieron con 1x PBS, y se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos. La pellet se resuspendió a 5x10⁴/ml. En una placa de 96 pocillos, las células se dividieron en partes alícuotas a 100 µl/pocillo (aproximadamente 5000 células/pocillo). Las células se incubaron a 37° C durante 24 horas.

Se añadió neuraminidasa bacteriana (de *Clostridium perfringens*), 10 µl a cada pocillo hasta una concentración final de 0,01 U/ml para SAEC y 0,008 U/ml para NHBE. Las células se incubaron a continuación durante 6 horas a 37° C.

25 La centrifugación de la placa se llevó a cabo a 1000 rpm durante 10 minutos, se aspiró el medio y se añadió 200 µl de medio nuevo. La placa se centrifugó de nuevo, y el medio se reemplazó con 100 µl de medio fresco.

Los compuestos para la prueba se prepararon a 6x la concentración deseada; se añadió 20 µl del compuesto a cada pocillo por triplicado. Las células se incubaron entonces a 37° C durante 24 horas.

30 Las células se marcaron durante la noche (aproximadamente 16 horas) a 37° C con 10 µl de etiqueta BrdU (kit ELISA de proliferación celular - Roche).

Se retiró el medio de marcaje y las células se fijaron y desnaturalizaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de fijación suministrada por el fabricante.

Después de la eliminación de la solución de fijación, se añadió a cada pocillo 100 µl de anti-BrdU-POD (a la concentración apropiada sugerida por el fabricante). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos.

35 Se eliminó el conjugado de anticuerpo y los pocillos se lavaron tres veces con 200 µl de solución de lavado (suministrada). Después de la eliminación de la solución de lavado, se añadió 100 µl de la solución de sustrato (suministrada); y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 50 µl de H₂SO₄ 1 M. La absorbancia de las muestras se midió a 450 nm (longitud de onda de referencia de 690 nm).

40 Células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas (SAECs) tratadas con 0,01 U/ml de neuraminidasa (NA) de *Clostridium perfringens*.

Viabilidad celular (promedio ± EEM (error estándar del promedio), n=20)	
Control (células normales)	100%
Control tratado con NA	72,82% ± 7,26

ES 2 709 680 T3

Células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBEs) tratadas con 0,008 U/ml de neuraminidasa (NA) de *Clostridium perfringens*.

Viabilidad celular (promedio \pm EEM, n=20)	
Control (células normales)	100%
Control tratado con NA	73,30% \pm 7,12

5 El ensayo de viabilidad celular normalmente dio una desviación operativa de \pm 10%. Por lo tanto, solo los resultados que mostraron viabilidad celular \geq 120% frente a la del control (tratado con neuraminidasa) se consideran significativos. Se indica que los compuestos con resultados positivos podrían restaurar la viabilidad celular en un plazo de 48 horas. Entre los compuestos de fórmula (1) y/o (2), los compuestos más activos con baja citotoxicidad fueron N-acetilmanosamina (Compuesto 1) y ácido N-acetilneuramínico (Compuesto 2).

• Método 2

10 *Células utilizadas:* células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas (SAECs)

Medio: kit de SAGM Bullet (suplemento de crecimiento + SABM)

Y/o

Células utilizadas: células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBEs)

Medio: kit BEGM Bullet (suplemento de crecimiento + BEBM)

15 *Detalles experimentales:*

Células crioconservadas (1 x 10⁶ células en 1 ml) se descongelaron y se cultivaron en una placa Petri de 175 cm² en medio completo. El medio se retiró al día siguiente y se reemplazó con medio nuevo. Las células se cultivaron durante aproximadamente 5-6 días para obtener una confluencia del 70-80%. Durante la fase de crecimiento. El medio se cambió cada dos días.

20 Cuando se obtuvo la confluencia apropiada, se eliminó el medio. La monocapa de células se lavó con 1x PBS. Tras la eliminación del PBS, se agregaron 2 ml de tripsina+EDTA. Las células se agitaron suavemente a temperatura ambiente durante 2 minutos. Las células se recogieron con 1x PBS, y se centrifugaron a 200 g durante 10 minutos. La pellet se resuspendió a 5x10⁴/ml. En una placa de 96 pocillos, las células se dividieron en partes alícuotas a 100 μ l/pocillo (aproximadamente 5000 células/pocillo). Las células se incubaron a 37° C durante 24 horas.

25 Se añadió neuraminidasa vírica (del virus de la influenza NWS/G70C), 10 μ l a cada pocillo hasta una concentración final de 0,017 μ g/ml. Las células se incubaron a continuación durante 6 horas a 37° C.

La centrifugación de la placa se llevó a cabo a 1000 rpm durante 10 minutos, se aspiró el medio y se añadió 200 μ l de medio nuevo. La placa se centrifugó de nuevo, y el medio se reemplazó con 100 μ l de medio fresco.

30 Los compuestos para la prueba se prepararon a 6x la concentración deseada; Se añadió 20 μ l del compuesto a cada pocillo por triplicado. Las células se incubaron entonces a 37° C durante 24 horas.

Las células se marcaron durante la noche (aproximadamente 16 horas) a 37° C con 10 μ l de etiqueta BrdU (kit ELISA de proliferación celular - Roche).

Se retiró el medio de marcaje y las células se fijaron y desnaturalizaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de fijación suministrada por el fabricante.

35 Después de la eliminación de la solución de fijación, se añadió a cada pocillo 100 μ l de anti-BrdU-POD (a la concentración apropiada sugerida por el fabricante). La placa se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos.

40 Se eliminó el conjugado de anticuerpo y los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de solución de lavado (suministrada). Después de la eliminación de la solución de lavado, se añadió 100 μ l de la solución de sustrato (suministrado); y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 50 μ l de H₂SO₄ 1 M. La absorbancia de las muestras se midió a 450 nm (longitud de onda de referencia de 690 nm).

Ejemplo 1. Preparación de N-acetil-D-manosamina (1).

[Compuesto (1), fórmula (1), B=H, A=NHCOCH₃, R¹=R²=R³=R⁴=H]

Se disolvió en 3 ml de agua 1 g de N-acetil-D-glucosamina obtenida por hidrólisis de quitina, luego se ajustó a

pH>11 usando una solución de NaOH al 30%. La mezcla se dejó reposar a 20° C~40° C durante 48 horas. La solución resultante se neutralizó a pH 6,5~7,0 con H₂SO₄ 5N, luego se evaporó a presión reducida hasta sequedad. El sólido se sometió a reflujo en etanol durante 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se evaporó al vacío hasta sequedad para proporcionar un sólido blanco que contenía 85% de N-acetil-D-manosamina y 15% de N-acetil-D-glucosamina, determinado por ¹H-RMN. Este sólido se recristalizó fraccionalmente en etanol/isopropanol/AE para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido blanco (125 mg, 62,5% basado en una tasa de conversión del 20% de N-acetil-D-manosamina). La N-acetil-D-glucosamina sin reaccionar (0,8 g) podría reutilizarse para el siguiente lote de reacción.

¹H-RMN (D₂O) δ (ppm)

10 5,15 (d, 0,7H), 3,85-3,32 (m, 6,3H), 1,99 (s, 3H).

MS 222 (M+1)

Ejemplo 2. Preparación de la sal sódica del ácido N-acetil-neuramínico (2).

[Compuesto (2), Fórmula (2), R⁸=R¹⁰=R¹¹=R¹²=R¹³=H, R⁹=Na]

15 Se añadió a una solución de pH 7,0~7,5 de N-acetilmanosamina (2,7 g, 12,2 mmoles) y piruvato de sodio (2,7 g, 24,5 mmoles) en agua (15 ml) una bolsa de diálisis (corte de PM de 20,000) que contenía N-acetilneuraminato liasa [EC 4.1.3.3] (25 unidades) en una mezcla de reacción de N-acetilmanosamina (0,54 g) y piruvato de sodio (0,54 g) en agua (3 ml) a pH 7,0-7,5. La mezcla de reacción se agitó a 60 r.p.m. a 30° C durante 5 días. La bolsa de enzimas se retiró y se reutilizó para un nuevo lote de reacción. La mezcla de reacción se diluyó con agua (15 ml) y luego se pasó a través de una columna de Amberlite IRA-400 (forma HCOO) (150 ml). La resina se lavó con agua (300 ml), se eluyó con una solución de HCOOH 0,5 M. El eluato se recogió y se evaporó al vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en agua (2 ml) y luego se diluyó con ácido acético glacial (10 ml) a 4° C durante la noche, se filtró los cristales, se lavó con EtOH, y se secó para proporcionar el ácido N-acetilneuramínico como un polvo cristalino blanco (1,5 g, 39,8%).

25 ¹H-RMN (D₂O) δ (ppm) 4,00 (m, 1H), 3,97 (m, 1H), 3,87 (d, 1H), 3,77 (dd, 1H), 3,67 (m, 1H), 3,55 (dd, 1H), 3,48 (d, 1H), 2,24 (dd, 1H, J = 13,2 Hz, 5,1 Hz), 1,98 (s, 3H), 1,83 (dd, 1H, J = 13,2 Hz, 11,5 Hz). EM 310 (M+1)

Se disolvió ácido N-acetilneuramínico (1 g, 3,23 mmoles) en agua (20 ml), luego se agitó con NaHCO₃ (0,26 g, 3,09 mmoles a pH 6~6,5), y después de secar por congelación se obtuvo el compuesto del epígrafe como un polvo blanco (1,05 g, 98%).

Ejemplo 3. Preparación de N-acetil-neuraminato de etilo (3).

30 A una suspensión de ácido N-acetil-neuramínico (1 g, 3,23 mmoles) en etanol anhidro (75 ml) se le agregó 1,5 ml de cloruro de acetilo. La mezcla se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas para formar una solución transparente. La solución resultante se evaporó al vacío hasta sequedad. El sólido blanco se lavó con acetato de etilo y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del epígrafe en forma de un sólido blanco (1 g, 91,7%).

¹H-RMN (D₂O) δ (ppm)

35 4,27 (q, 2H), 4,04 (m, 2H), 3,91 (d, 1H), 3,78 (dd, 1H), 3,68 (dd, 1H), 3,57 (dd, 1H), 3,52 (d, 1H), 2,28 (dd, 1H), 2,01 (s, 3H), 1,88 (dd, 1H), 1,28 (t, 3H).

EM 338 (M+1), 360 (M+23)

Ejemplo 4. Preparación de 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-o-acetil-3,5-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosonato de etilo (5-acetamido-4,7,8,9-tetra-o-acetil-neuraminato de etilo) (4).

40 Se añadió a una solución agitada de anhídrido acético (0,72 g) y ácido perclórico acuoso al 60% (5 μl) a 40° C, en porciones durante 30 minutos 5-acetamido-neuraminato de etilo (230 mg, 0,68 mmoles). La mezcla resultante se agitó a 40° C durante 2 horas. Después se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua fría (10 ml), se saturó con sulfato de amonio, se extrajo con acetato de etilo (40 ml x 3). Los extractos orgánicos se combinaron y se lavaron con solución saturada de NaHCO₃ y agua sucesivamente. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se evaporó a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en acetato de etilo, se diluyó con hexano para dar el compuesto del epígrafe en forma de un cristal blanco (223 mg, 65%).

¹H-RMN (CDCl₃) δ (ppm)

50 5,71 (m, 1H), 5,36 (dd, 1H, J=1,5 Hz, 5,6 Hz), 5,25 (ddd, 1H, J=2,4 Hz, 7,5 Hz), 5,22 (ddd, 1H, J=11,4 Hz, 5,4 Hz, 9,5 Hz), 4,51 (dd, 1H, J=12,4 Hz), 4,47 (d, 1H, J=0,8 Hz), 4,21~4,13 (m, 4H), 4,03 (dd, 1H), 2,26 (ddd, 1H, 12,8 Hz), 2,19 (dd, 1H), 2,15, 2,11, 2,03, 2,02 y 1,91 (5s, 15H), 1,29 (t, 3H, J=7,2 Hz).

EM 506 (M+1)

Ejemplo 5. Preparación del ácido citidina-5'-monofosfo-5-acetamido-3,5,-didesoxi-β-D-glicero-D-galacto-2-nonulopiranosónico (ácido CMP-siálico) (5).

Se disolvieron ácido N-acetilneuramínico (100 mg, 0,32 mmoles), y la sal de sodio de citidina-5'-trifosfato (156,3 mg, 0,32 mmoles) en 32 ml de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8,8) que contenía MgCl₂ (20 mM). A esta solución se le añadió CMP-Neu5Ac sintetasa (5 mg, de N. meningitidis). La mezcla de reacción se incubó a 37^o C durante 2~3 horas mientras se monitorizaba por CCF (gel de sílice, EtOH:NH₄HCO₃ 1 M = 7:3). La mezcla de reacción se diluyó con metanol (50 ml) y se filtró. El filtrado se evaporó a presión reducida hasta sequedad. El residuo se cromatografió en resina Bio Gel P-2 (50 ml) para proporcionar el compuesto del epígrafe después de liofilizarlo en forma de un polvo cristalino blanco (147 mg, 75%).

10 Análisis de HPLC:

- Columna C-18.

- Fase móvil: tampón A (tampón de fosfato de potasio 0,1 M, complementado con bisulfato de tetra-butilamonio 8 mM, pH 5,3) y tampón B (70% tampón A más 30% metanol, pH 5,9)

- Gradiente:

15 100% de tampón A durante 2,5 minutos, 0~40% de tampón B durante 7,5 min, 40~100% de tampón B durante 1 minuto, 100% de tampón B durante 4 minutos, 100~0% de tampón B durante 1 minuto, seguido de una fase de equilibrio de tampón A 100% durante 4 minutos.

- Caudal: 1 ml/minuto.

- Detección UV a 270 nm

20 ¹H-RMN (D₂O) δ (ppm)

7,87 (d, 1H, J=7,6 Hz), 6,25 (d, 1H, J=7,6 Hz), 5,91 (d, 1H, J=4,4 Hz), 4,26~4,20 (m, 2H), 4,17~4,10 (m, 3H), 4,09~3,98 (m, 2H), 3,90~3,80 (m, 3H), 3,59~3,40 (m, 2H), 2,42 (dd, 1H, J=4,8, 13,2 Hz), 1,98 (s, 3H), 1,60 (dt, 1H, J=5,6, 12,6 Hz).

EM 635 (M²⁺+Na⁺)

25 Ejemplo 6. Preparación de 5-acetamido-8,9-O-isopropiliden-neuraminato de etilo (6).

Se añadió a una solución de 5-acetamido-neuraminato de etilo (150 mg, 0,445 mmoles) en DMF anhidra (2 ml) 2,2-dimetoxipropano (1 ml, 8 mmoles) y Amberlyst 15 (50 mg). La mezcla se agitó a 60^o C durante 7 horas, después se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se evaporó a presión reducida hasta sequedad. CCF (gel de sílice, AE/MeOH=10:4) indicó la finalización de la reacción. El residuo se redisolvió en AE/MeOH=10/1 (1 ml), y luego se sometió a cromatografía ultrarrápida en columna. Las fracciones requeridas se combinaron y se evaporaron al vacío hasta sequedad para proporcionar el compuesto del epígrafe como una espuma blanca (135 mg, 75%).

¹H-RMN (D₂O) δ (ppm)

4,28~4,23 (m, 2H), 4,23~4,11 (m, 2H), 4,08~3,92 (m, 2H), 3,96~3,52 (m, 3H), 2,31 (dd, 1/3H), 2,23 (dd, 2/3H), 1,99 (s, 3H), 1,82 (dd, 2/3H), 1,70 (dd, 1/3H), 1,36 (s, 3H), 1,32 (s, 3H), 1,25 (t, 3H).

35 EM 428 (M+Na)

Ejemplo 7: Actividad del Compuesto (1) sobre la recuperación de la viabilidad de células epiteliales de vías aéreas pequeñas (SAECs)

Compuesto (1) [Fórmula (1), B=H, A=NHCOCH₃, R¹=R²=R³=R⁴=H]

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (1) 50 µg/ml	171% ± 6,33
12,5 µg/ml	175% ± 2,33
3,1 µg/ml	146% ± 7,10
0,77 µg/ml	139% ± 3,46
0,19 µg/ml	157% ± 4,47

Ejemplo 8: Actividad del Compuesto (1) sobre la recuperación de la viabilidad de las células del bronquio humanas normales/Células epiteliales de la tráquea normales (NHBEs)

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (1)	125% ± 3,20
50 µg/ml	
12,5 µg/ml	124% ± 2,21
3,1 µg/ml	120 ± 0,79
0,77 µg/ml	119% ± 2,23
0,19 µg/ml	116% ± 1,42

Ejemplo 9. Actividad del compuesto (2) sobre la recuperación de la viabilidad de SAEC

5 Compuesto (2) [Fórmula (2), R⁸=R¹⁰=R¹¹=R¹²=R¹³=H, R⁹=Na]

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (2)	129% ± 3,96
50µg/ml	
12,5 µg/ml	127% ± 2,51
3,1 µg/ml	115% ± 1,56
0,77 µg/ml	130% ± 2,18
0,19 µg/ml	129% ± 3,22
0,05 µg/ml	138% ± 050
0,012 µg/ml	140% ± 2,15
0,003 µg/ml	124% ± 1,91

Ejemplo 10: Actividad del Compuesto (2) en la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (2)	137% ± 1,00
50 µg/ml	
12,5 µg/ml	127% ± 4,02
3,1 µg/ml	117% ± 3,22
0,77 µg/ml	117% ± 0,68
0,19 µg/ml	126% ± 0,21

Ejemplo 11. Actividad del Compuesto (3) sobre la recuperación de la viabilidad de SAECs

10 Compuesto (3) [Fórmula (2), R⁸=R¹⁰=R¹¹=R¹²=R¹³= H, R⁹=C₂H₅]

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (3)	104% ± 1,66

50 µg/ml	
12,5 µg/ml	107% ± 0,41
3,1 µg/ml	109% ± 1,41
0,77 µg/ml	103% ± 3,43
0,05 µg/ml	104% ± 1,46

Ejemplo 12: Actividad del Compuesto (3) sobre la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (3)	106% ± 1,35
50 µg/ml	
12,5 µg/ml	100% ± 0,88
3,1 µg/ml	113% ± 0,84
0,77 µg/ml	111% ± 4,73
0,19 µg/ml	114% ± 5,14
0,05 µg/ml	130% ± 5,19
0,012 µg/ml	130% ± 6,11
0,003 µg/ml	154% ± 4,91

Ejemplo 13: Actividad del compuesto (4) sobre la recuperación de la viabilidad de SAECs

5 Compuesto (4) [Fórmula (2), R⁸=H, R⁹=C₂H₅, R¹⁰=R¹¹=R¹²=R¹³=CH₃CO]

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (4)	99% ± 4,00
50 µg/ml	
12,5 µg/ml	97% ± 3,00
3,1 µg/ml	100% ± 1,80
0,77 µg/ml	115% ± 4,40
0,19 µg/ml	121% ± 1,80
0,05 µg/ml	106% ± 6,09
0,012 µg/ml	116% ± 0,10
0,003 µg/ml	110% ± 1,09

Ejemplo 14: Actividad del compuesto (4) sobre la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (4)	110% ± 1,02
50 µg/ml	
12,5 µg/ml	117% ± 0,29

3,1 µg/ml	111% ± 4,54
0,77 µg/ml	110% ± 3,77
0,19 µg/ml	125% ± 1,46
0,05 µg/ml	115% ± 5,22
0,012 µg/ml	113% ± 6,85
0,003 µg/ml	83% ± 0,88

Ejemplo 15: Actividad del Compuesto (5) sobre la recuperación de la viabilidad de SAECs

Compuesto (5) [Fórmula (2), R⁸=monofosfato de citidina, R⁹=R¹⁰=R¹¹=R¹²=R¹³=H]

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (5) 50 µg/ml	116% ± 5,30
12,5 µg/ml	108% ± 1,20
3,1 µg/ml	141% ± 1,70
0,77 µg/ml	141% ± 1,09
0,19	145 ± 4,89

5 Ejemplo 16: Actividad del compuesto (5) sobre la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (5) 50 µg/ml	116% ± 0,93
12,5 µg/ml	109% ± 3,60
3,1 µg/ml	112% ± 2,59
0,77 µg/ml	109% ± 1,92
0,19 µg/ml	89% ± 0,79

Ejemplo 17: Actividad del compuesto (6) sobre la recuperación de la viabilidad de SAECs

Compuesto (6) [Fórmula (2), R⁸=H, R⁹=C₂H₅, R¹⁰=R¹¹=H, R¹² y R¹³= >C(CH₃)₂]

	Viabilidad de las células (promedio±EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (6) 50 µg/ml	119% ± 3,17
12,5 µg/ml	125% ± 1,13
3,1 µg/ml	123% ± 5,02
0,77 µg/ml	135% ± 3,27
0,19 µg/ml	140% ± 1,92

Ejemplo 18. Actividad del compuesto (6) sobre la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (6)	90% ± 8,36
50 µg/ml	
12,5 µg/ml	99% ± 3,17
3,1 µg/ml	121% ± 2,10
0,77 µg/ml	128% ± 3,60
0,19 µg/ml	133% ± 0,88
0,05 µg/ml	127% ± 1,81
0,012 µg/ml	122% ± 3,33
0,003 µg/ml	141% ± 4,70

Ejemplo 19: Actividad del compuesto (7) sobre la recuperación de la viabilidad de SAECs

Compuesto (7) [Fórmula (1), B=H, A=NHCOCH₃, R¹=R²=R³=R⁴=COCH₃]

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (7) 50 µg/ml	73% ± 2,18
12,5 µg/ml	134% ± 0,81
3,1 µg/ml	103% ± 1,14
0,77 µg/ml	112% ± 1,29
0,19 µg/ml	105% ± 2,01
0,05 µg/ml	128% ± 1,98
0,012 µg/ml	105% ± 1,83
0,003 µg/ml	102% ± 0,62

Ejemplo 20: Actividad del compuesto (7) sobre la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (7) 50 µg/ml	54% ± 0,98
12,5 µg/ml	117% ± 4,12
3,1 µg/ml	98% ± 5,65
0,77 µg/ml	99% ± 1,93
0,19 µg/ml	100% ± 0,66
0,05 µg/ml	104% ± 5,85
0,012 µg/ml	103% ± 4,70
0,003 µg/ml	85% ± 2,71

Ejemplo 21. Actividad del compuesto (8) sobre la recuperación de la viabilidad de SAECs

Compuesto (8) [Fórmula (1), B=H, A=NHCOCH₃, R¹=H, R²=R³=R⁴=COCH₃]

	Viabilidad de las células (promedio ± SEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (8) 50 µg/ml	91% ± 3,36
12,5 µg/ml	104% ± 1,95
3,1 µg/ml	109% ± 2,79
0,77 µg/ml	103% ± 3,21
0,19 µg/ml	115% ± 3,52
0,05 µg/ml	109% ± 1,16
0,012 µg/ml	No determinado
0,003 µg/ml	125% ± 8,51

Ejemplo 22: Actividad del compuesto (8) en la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (8) 50 µg/ml	42% ± 1,55
12,5 µg/ml	81% ± 0,60
3,1 µg/ml	111% ± 2,44
0,77 µg/ml	133% ± 2,09
0,19 µg/ml	96% ± 1,21
0,05 µg/ml	93% ± 1,38
0,012 µg/ml	118% ± 3,19
0,003 µg/ml	129% ± 1,70

Ejemplo 23: Actividad del Compuesto (9) sobre la recuperación de la viabilidad de SAECs

Compuesto (9) [Fórmula (1), A=H, B=NHCOCH₃, R¹=R²=R³=R⁴=H] - no en el alcance de la invención reivindicada

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (9) 50 µg/ml	122% ± 3,21
12,5 µg/ml	119% ± 3,04
3,1 µg/ml	115% ± 3,17
0,77 µg/ml	120% ± 3,14
0,19 µg/ml	121% ± 2,42

ES 2 709 680 T3

Ejemplo 24. Actividad del compuesto (9) sobre la recuperación de la viabilidad de NHBEs - no en el alcance de la invención reivindicada

	Viabilidad de las células (promedio \pm EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (9) 50 μ g/ml	106% \pm 2,52
12,5 μ g/ml	106% \pm 3,49
3,1 μ g/ml	108% \pm 3,24
0,77 μ g/ml	107% \pm 1,26
0,19 μ g/ml	107% \pm 3,41

Ejemplo 25. Actividad de D-glucosa en la recuperación de la viabilidad de SAECs

	Viabilidad de las células (promedio \pm EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
D-glucosa 50 μ g/ml	94% \pm 3,04
12,5 μ g/ml	103% \pm 1,05
3,1 μ g/ml	101% \pm 2,30

Ejemplo 26: Actividad de D-glucosa en la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio \pm EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
D-glucosa 50 μ g/ml	106% \pm 2,76
12,5 μ g/ml	104% \pm 2,13
3,1 μ g/ml	107% \pm 3,05
0,77 μ g/ml	99% \pm 3,15
0,19 μ g/ml	104% \pm 2,96

Ejemplo 27. Actividad del Compuesto (1) a alta concentración en la recuperación de la viabilidad de SAECs

	Viabilidad de las células (promedio \pm EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (1) 5 mg/ml	118% \pm 2,15
1,25 mg/ml	121% \pm 3,02
312,5 μ g/ml	115% \pm 1,51
78,1 μ g/ml	127% \pm 2,30

Ejemplo 28: Actividad del Compuesto (1) a alta concentración en la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (1) 5 mg/ml	116% ± 2,11
1,25 mg/ml	125% ± 2,02
312,5 µg/ml	131% ± 3,04
78,1 µg/ml	128% ± 1,85

Ejemplo 29: Actividad del Compuesto (2) a alta concentración en la recuperación de la viabilidad de SAECs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (2) 5 mg/ml	129% ± 1,76
1,25 mg/ml	115% ± 1,38
312,5 µg/ml	118% ± 1,95
78,1 µg/ml	135% ± 2,06

5 Ejemplo 30: Actividad del Compuesto (2) a alta concentración en la recuperación de la viabilidad de NHBE

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (2) 5 mg/ml	122% ± 2,05
1,25 mg/ml	129% ± 3,13
312,5 µg/ml	118% ± 2,17
78,1 µg/ml	107% ± 1,38

Ejemplo 31: Actividad del Compuesto (9) a alta concentración en la recuperación de la viabilidad de SAECs - no en el alcance de la invención reivindicada

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratamiento con neuraminidasa)	100%
Compuesto (9) 5 mg/ml	83% ± 2,85
1,25 mg/ml	96% ± 3,16
312,5 µg/ml	90% ± 3,28
78,1 µg/ml	100% ± 2,92

Ejemplo 32: Actividad del Compuesto (9) a alta concentración en la recuperación de la viabilidad de NHBEs - no en el alcance de la invención reivindicada

	Viabilidad de las células (promedio±EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Compuesto (9) 5 mg/ml	76% ± 2,71
1,25 mg/ml	96% ± 2,42
312,5 µg/ml	95% ± 2,85
78,1 µg/ml	125% ± 3,23

5 Ejemplo 33: Actividad de una mezcla del Compuesto (1) (85%) y del compuesto (9) (15%) a alta concentración en la recuperación de la viabilidad de SAEC

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Mezcla del compuesto (1) y (9) 5 mg/ml	88% ± 1,82
1,25 mg/ml	91% ± 2,03
312,5 µg/ml	87% ± 2,52
78,1 µg/ml	94% ± 1,91

Ejemplo 34: Actividad de una mezcla de Compuesto (1) (85%) y Compuesto (9) (15%) a alta concentración en la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Mezcla del compuesto (1) y (9) 5 mg/ml	89% ± 2,31
1,25 mg/ml	107% ± 2,48
312,5 µg/ml	105% ± 2,02
78,1 µg/ml	95% ± 3,12

10 Ejemplo 35: Actividad de una mezcla de Compuesto (1) (85%) y Compuesto (9) (15%) sobre la recuperación de la viabilidad de SAECs

	Viabilidad de las células (promedio ± EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Mezcla del compuesto (1) y (9) 50 µg/ml	101% ± 3,41
12,5 µg/ml	107% ± 3,91
3,1 µg/ml	121% ± 4,82
0,77 µg/ml	120% ± 4,11
0,19 µg/ml	115% ± 4,02
0,05 µg/ml	113% ± 4,30
0,01 µg/ml	107% ± 4,12
0,003 µg/ml	108% ± 4,20

ES 2 709 680 T3

Ejemplo 36. Actividad de una mezcla de Compuesto (1) (85%) y Compuesto (9) (15%) en la recuperación de la viabilidad de NHBEs

	Viabilidad de las células (promedio \pm EEM, n=3)
Control (tratado con neuraminidasa)	100%
Mezcla del compuesto (1) y (9) 50 μ g/ml	121% \pm 2,05
12,5 μ g/ml	109% \pm 1,98
3,1 μ g/ml	115% \pm 1,76

Ejemplo 37. Experimentos de tos en cobayas^{[9][10]}

5 Cobayas macho fueron alojados en corrales y tenían acceso a agua y alimentos a voluntad. Este estudio fue aprobado por el Comité del Instituto de ética animal Bio21 (Bio21 Institute Animal Ethics Committee).

10 Veinticuatro cobayas macho Hartley conscientes (500–550 g) se dividieron en tres grupos A, B, C (8 animales por cada grupo) y se pretrataron con 5 unidades/ml de solución de neuraminidasa (Sigma N2133, polvo liofilizado, Tipo X, 150–400 unidades/mg de proteína) en agua (grupos B y C) o solución salina sola (grupo A) vía un aerosol durante 5 minutos en el día uno. Después, en el día uno, dos y tres, los cobayas fueron administrados oralmente con 500 mg/kg del Compuesto (1) (grupo C), o agua sola (grupos A y B). En el día cuatro, todos los animales se expusieron a una solución de ácido cítrico 0,5 M (nebulizada, 10 minutos de exposición). La frecuencia de la tos, los tiempos hasta la primera, segunda y tercera tos, y los tiempos hasta la primera frotación de la nariz se registraron durante un período de 15 minutos. Los resultados indicaron una tendencia del Compuesto (1) a ayudar a restaurar los daños causados por la neuraminidasa.

15

	Frecuencia de la tos (en 15 minutos)
Grupo A (solución salina solamente, como control)	13 \pm 2,5
Grupo B (tratado con neuraminidasa, como control negativo)	19 \pm 2,5
Grupo C (primeramente, tratado con neuraminidasa, después con el Compuesto (1) durante 3 días)	16 \pm 2,2

	Tiempo (segundos) para la		
	1ª tos	2ª tos	3ª tos
Grupo A (agua solamente, como control)	87 \pm 10	157 \pm 23	200 \pm 25
Grupo B (tratado con neuraminidasa, como control negativo)	70 \pm 11	109 \pm 6	150 \pm 20
Grupo C (primeramente, tratado con neuraminidasa, después tratado con el Compuesto (1) durante 3 días)	85 \pm 15	135 \pm 31	220 \pm 10

	Tiempo (segundos) para el primer frotado de nariz
Grupo A (solo agua, como control)	50 ± 4,3
Grupo B (tratado con neuraminidasa, como control negativo)	27,7 ± 3,6
Grupo C (En primer lugar tratado con neuraminidasa luego se trata con Compuesto (1) durante 3 días)	49 ± 6,5

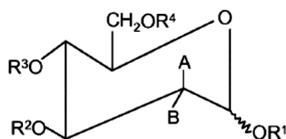
Usando el Compuesto (2) en lugar del Compuesto (1) por el mismo protocolo experimental, se obtuvieron resultados similares.

5 Bibliografía

- [1] Edelman, G.M. y Crossin, K.L. Cell adhesion molecules: Implications for a molecular histology. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 155-190 (1991).
- [2] Varki A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2, 25-40 (1992).
- [3] Schauer, R., et al. Biochemistry and role of sialic acids. In: *Biology of the sialic acids*.
- 10 A. Rosenberg, editor, Nueva York, Estados Unidos. Páginas 7-67 (1995).
- [4] Rens-Domiano, S. y Reisine, T. Structural análisis and functional role of the carbohydrate component of somatostatin receptors. *J. Biol. Chem.* 266, 20094-20102 (1991).
- [5] Keppler, O. T., et al. *Science* 284 (5418), 1372-1376 (1999).
- [6] Miyata, T., et al. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 296, 202-9 (1988).
- 15 [7] Miyata, T., et al. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 304, 277-89 (1990).
- [8] Amir, S.M., et al. *Nature*, 211 (5052), 976-7 (1966).
- [8b] B. Galeano et al. Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. *J. Clin. Invest.* 2007 117 (6) 1585-1594.
- [8c] Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº. 60/932.451 presentada el 31 de mayo de 2007.
- 20 [9] Laude, E.A. et al, "A comparative study of the effects of Citric acid, capsaicin and Resiniferatoxin on the Cough challenge in Guinea-pig and Man". *Pulmonary Pharmacology* 6, 171-175 (1993).
- [10] Tanaka, M. et al, "Mecanismos of Capsaicin and Citric acid induced Cough Reflexes in Guinea pig". *J. Pharmacol. Sci.*, 99, 77-82 (2005).
- 25 Las solicitudes de patente futuras se pueden presentar sobre la base de o la reivindicación de prioridad de la presente solicitud. Debe entenderse que las siguientes reivindicaciones se proporcionan solo a modo de ejemplo, y no pretenden limitar el alcance de lo que se puede reivindicar en una futura solicitud de este tipo. Las características se pueden agregar u omitir en las reivindicaciones en una fecha posterior para definir o redefinir la invención o invenciones.
- 30 Finalmente, debe entenderse que se pueden realizar varias otras modificaciones y/o se pueden hacer alteraciones sin apartarse del espíritu de la presente invención como se describe en este documento.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la Fórmula 1 o la Fórmula 2 farmacéuticamente aceptable en donde la Fórmula (1) tiene la fórmula



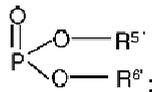
Fórmula (1)

en donde,

R¹, R², R³ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), CH₂Fenilo, COCR⁵R⁶R⁷ y ésteres de CO;

10 R⁵, R⁶, R⁷ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), C₆H₅, CH₂Fenilo y CH₃CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200);

R⁴ es igual o diferente a R¹, R², R³ y se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20),



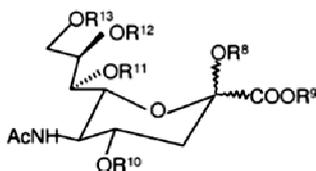
CH₂Fenilo, COCR⁵R⁶R⁷, ésteres de CO y

R⁵, R⁶ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o una sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente adecuada, y un éster farmacéuticamente adecuado;

15 B es H, y A se selecciona del grupo que consiste en NHCOCH₃, NH₂, y NH₂ HX, en donde HX representa un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente adecuado;

y

en donde la Fórmula (2) tiene la fórmula



Fórmula (2)

en donde,

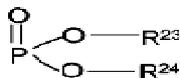
25 R⁸ se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1-20), CH₂Fenilo, COCH₂Fenilo, éster de CO y COCR¹⁴R¹⁵R¹⁶; en donde R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), C₆H₅, CH₂Fenilo, CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200); citidina, monofosfato de citidina, difosfato de citidina, trifosfato de citidina, adenosina, monofosfato de adenosina, difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina;

30 R⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, una sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable, o un éster farmacéuticamente adecuado; CH₂CR¹⁷R¹⁸R¹⁹ en donde R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200), C₆H₅ y CH₂Fenilo;

R¹⁰, R¹¹, R¹² son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), CH₂Fenilo, éster y COCR²⁰R²¹R²² en donde R²⁰, R²¹ y R²² son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), C₆H₅, CH₂Fenilo, CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m = 1-200);

35 R¹³ es igual o diferente a R¹⁰, R¹¹, R¹² y se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1-20),

CH₂Fenilo, éster y COCR²⁰R²¹R²² en donde R²⁰, en donde R²¹, R²² son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), C₆H₅, CH₂Fenilo, CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200) y



- 5 R²³, R²⁴ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1-20), CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200), CH₂Fenilo, o éster y CH₂CR²⁵R²⁶R²⁷, o sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable, y R²⁵, R²⁶, R²⁷ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), y C₆H₅, CH₂Fenilo,

10 para uso en una cantidad eficaz para promover la recuperación de la viabilidad celular en una célula respiratoria dañada en un sujeto afectado por una infección respiratoria para el tratamiento de una afección respiratoria.

2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde la alteración respiratoria se selecciona del grupo que consiste en la tos, infecciones post bacterianas o post víricas, bronquitis aguda/crónica, enfermedad obstructiva crónica del pulmón (EPOC), fibrosis cística y otras afecciones inflamatorias respiratorias.

15 3. El compuesto para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en N-acetil manosamina, ácido N-acetilneuramínico, N-acetil-neuraminato de etilo, 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-neuraminato de etilo, ácido CMP-siálico, 5-acetamido-8,9-O-isopropildineuraminato de etilo y sus sales farmacéuticamente aceptables y combinaciones de los mismos.

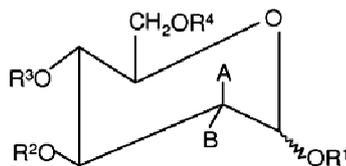
4. El compuesto para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de Fórmula (1) en donde

20 -B=H, A=NHCOCH₃, R¹=R²=R³=R⁴=COCH₃; y

-B=H, A=NHCOCH₃, R¹=H, R²=R³=R⁴=COCH₃

5. Una composición farmacéutica que incluye una cantidad eficaz de al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en los compuestos de Fórmula (1) y los compuestos de Fórmula (2),

25 en donde la Fórmula (1) tiene la fórmula:



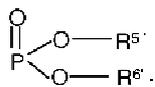
Fórmula (1)

en donde,

30 R¹, R², R³ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), CH₂Fenilo, COCR⁵R⁶R⁷ y ésteres de CO;

R⁵, R⁶, R⁷ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), C₆H₅, CH₂Fenilo y CH₃CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200);

R⁴ es igual o diferente a R¹, R², R³ y se selecciona del grupo que consiste de H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), CH₂Fenilo, COCR⁵R⁶R⁷, ésteres de CO y

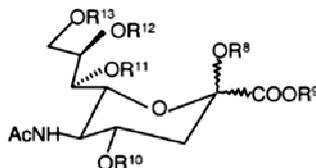


35 R⁵, R⁶ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H o una sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente adecuada, y un éster farmacéuticamente adecuado;

B es H, y A se selecciona del grupo que consiste en NHCOCH₃, NH₂, y NH₂ HX, en donde HX representa un ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente adecuado;

y

en donde la Fórmula (2) tiene la fórmula



Fórmula (2)

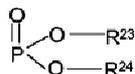
5 en donde,

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1-20), CH₂Fenilo, COCH₂Fenilo, éster de CO y COCR¹⁴R¹⁵R¹⁶; en donde R¹⁴, R¹⁵, R¹⁶ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), C₆H₅, CH₂Fenilo, CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200); citidina, monofosfato de citidina, difosfato de citidina, trifosfato de citidina, adenosina, monofosfato de adenosina, difosfato de adenosina y trifosfato de adenosina;

R⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, una sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable, o un éster farmacéuticamente adecuado; CH₂CR¹⁷R¹⁸R¹⁹ en donde R¹⁷, R¹⁸, R¹⁹ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200), C₆H₅ y CH₂Fenilo;

R¹⁰, R¹¹, R¹² son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), CH₂Fenilo, éster y COCR²⁰R²¹R²² en donde R²⁰, R²¹ y R²² son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), C₆H₅, CH₂Fenilo, y CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m = 1-200);

R¹³ es igual o diferente a R¹⁰, R¹¹, R¹² y se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1-20), CH₂Fenilo, éster y COCR²⁰R²¹R²² en donde R²⁰, R²¹, R²² son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), C₆H₅, CH₂Fenilo, y CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200) y



R²³, R²⁴ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n = 1-20), CH₂CH₂(OCH₂CH₂)_mCH₃ (m=1-200), CH₂Fenilo, o éster y CH₂CR²⁵R²⁶R²⁷, o una sal inorgánica u orgánica farmacéuticamente aceptable, y R²⁵, R²⁶, R²⁷ son iguales o diferentes y cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (CH₂)_nCH₃ (n=1-20), y C₆H₅, CH₂Fenilo,

para su uso a fin de promover la recuperación de la viabilidad celular de una célula respiratoria dañada en un sujeto afectado por una infección respiratoria para el tratamiento de una afección respiratoria.

6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, en donde la afección respiratoria se selecciona del grupo que consiste en la tos, infecciones pos-bacterianas o post-víricas, bronquitis aguda/crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis cística y otras afecciones inflamatorias respiratorias.

7. La composición farmacéutica para uso, según las reivindicaciones 5 o 6, en donde el al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en N-acetilmanosamina, ácido N-acetilneuramínico, N-acetil-neuraminato de etilo, 5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-neuraminato de etilo, ácido CMP-sialico, 5-acetamido-8,9-O-isopropildineuraminato de etilo y sus sales farmacéuticamente aceptables y combinaciones de los mismos.

8. La composición farmacéutica para uso según las reivindicaciones 5 o 6, en donde el al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en los compuestos de Fórmula 1 en donde

- B=H, A=NHCOCH₃, R¹=R²=R³=R⁴=COCH₃; y
- B=H, A=NHCOCH₃, R¹=H, R²=R³=R⁴=COCH₃.

9. El compuesto o composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el

compuesto se administra en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a 500 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente en el intervalo de 0,1 mg a 50 mg/kg/día.

10. El compuesto o composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto o composición se administra por vía oral en el intervalo de 1 mg/kg/día a 500 mg/kg/día.

5 11. El compuesto o composición para uso según la reivindicación 10, en donde el compuesto se administra en el intervalo de 5 mg a 50 mg/kg, dos o tres veces al día durante de 5 a 10 días.

12. El compuesto o composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto se administra por inyección en el intervalo de 1 mg/kg/día a 100 mg/kg/día.

10 13. El compuesto o composición para uso según la reivindicación 12, en donde el compuesto se administra en el intervalo de 5 mg a 50 mg/kg, dos o tres veces al día durante de 5 a 10 días.

14. El compuesto o composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el compuesto se administra por inhalación en el intervalo de 0,01 mg/kg/día a 5 mg/kg/día.

15. El compuesto o composición para uso según la reivindicación 14, en donde el compuesto se administra en el intervalo de 0,1 a 0,5 mg/kg/día, de una a cinco veces al día, de una a cinco veces al día durante de 5 a 10 días.

15