

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 303**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/426 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2017 PCT/US2017/024976**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017 WO17173056**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2017 E 17716741 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3436074**

54 Título: **Compuestos de tiazolida para tratar infecciones virales**

30 Prioridad:

31.03.2016 US 201662316463 P

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

08.03.2021

73 Titular/es:

**ROMARK LABORATORIES, L.C. (100.0%)
3000 Bayport Drive Suite 200
Tampa, FL 33607, US**

72 Inventor/es:

**ROSSIGNOL, JEAN-FRANCOIS y
SANTORO, MARIA GABRIELLA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 810 303 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

Compuestos de tiazolida para tratar infecciones virales

5 **Prioridad**

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense n.º 62/316.463 presentada el 31 de marzo de 2016.

10 **Campo**

La presente solicitud se refiere en general a compuestos de tiazolida y más particularmente, a su uso en el tratamiento de determinadas infecciones virales.

15 **Sumario**

El tratamiento de una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*, comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende al menos uno de nitazoxanida o tizoxanida o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un diagrama de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes infectados con virus respiratorio sincicial (VRS) tratados con nitazoxanida y placebo. TTSALL significa tiempo hasta el alivio de los síntomas (horas). Este gráfico muestra que el tratamiento con nitazoxanida se asoció con una reducción de 76 horas en la duración de los síntomas en la mediana.

La figura 2 es un diagrama de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes infectados con un virus que pertenece al género *Enterovirus* (incluyendo enterovirus y rinovirus) identificado como su única causa de enfermedad y tratados con a) nitazoxanida; b) nitazoxanida y oseltamivir; c) oseltamivir y d) placebo.

La figura 3 es un diagrama de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes infectados con un virus que pertenece al género *Enterovirus* (incluyendo enterovirus y rinovirus) identificados como su única causa de enfermedad y tratados con a) nitazoxanida *per se* o una combinación de nitazoxanida y oseltamivir y b) oseltamivir *per se* o placebo.

La figura 4A-B ilustra la actividad antiviral de nitazoxanida en células AGMK infectadas con el virus Sendai. En particular, la figura 4A presenta un gráfico que muestra la inhibición del virus Sendai en función de la concentración de nitazoxanida. La figura 4B presenta fotografías de control, virus Sendai no tratado y virus Sendai tratado con nitazoxanida.

La figura 5 presenta gráficos de inhibición para el virus Sendai (SeV) en función de la concentración de nitazoxanida para diferentes multiplicidades de infección y diferentes tipos de células. Los datos en la figura 5 muestran que la actividad antiviral de nitazoxanida en células infectadas con SeV es independiente de la multiplicidad de infección y el tipo de célula.

La figura 6 presenta datos de SDS-PAGE que demuestran el efecto de la nitazoxanida en la síntesis de proteínas de SeV.

La figura 7 presenta datos de SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western que demuestran el efecto de la nitazoxanida en la síntesis de proteínas SeV-F.

La figura 8 presenta datos de inmunotransferencia de tipo Western que demuestran la detección de la forma inmadura de la proteína SeV-F en la fracción insoluble de extractos de proteína AGMK tratados con nitazoxanida (NTZ).

La figura 9 presenta datos de inmunotransferencia de tipo Western que demuestran la detección de la forma inmadura de la proteína SeV-F en la fracción insoluble de extractos de proteína AGMK tratados con nitazoxanida (NTZ).

La figura 10 presenta fotografías, que proporcionan evidencia de que la nitazoxanida inhibe el transporte de la glicoproteína F del virus Hendra (HeV) a la superficie celular.

La figura 11A-C ilustra la inhibición del virus paragripal SeV por nitazoxanida en células AGMK. A, B NTZ inhibe la replicación de SeV en condiciones de crecimiento de virus de una sola etapa (A) y de etapas múltiples (B). Las células de riñón de mono AGMK infectadas con SeV se trataron con diferentes concentraciones de NTZ o vehículo inmediatamente después del periodo de adsorción del virus. La producción de viriones (○) se determinó a las 24 (A) o 48 (B) h después de la infección (p.i.) mediante valoración con hemaglutinina (paneles de la derecha) y ensayo de

placa (paneles de la izquierda). La producción de viriones, expresado en unidades de HA (UHA)/ml o UFP/ml, representa la media \pm DE de las muestras cuadruplicadas. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$. La viabilidad celular de las células infectadas de forma simulada (Δ) se determinó mediante el ensayo MTT. (C) Efecto citoprotector de NTZ (10 $\mu\text{g/ml}$) en células AGMK infectadas con SeV a las 24 h p.i. NTZ fue eficaz para inhibir la replicación de SeV a concentraciones que no eran tóxicas para las células huésped. NTZ fue realmente citoprotector en células infectadas. De hecho, la infección por SeV (3 UFP/célula) generalmente se caracteriza por un efecto citopático masivo, que provoca un cambio en la forma y el tamaño de la célula y una pérdida de adhesión (panel C, SeV). El tratamiento con NTZ (10 $\mu\text{g/ml}$), además de inhibir la producción de progenie de virus, también protegió a las células AGMK del daño inducido por virus (panel C, SeV + NTZ). La información en la figura 11A-C es similar a la información de la figura 4A-B.

La figura 12 presenta datos que demuestran la inhibición del virus paragripal SeV por nitazoxanida en células alveolares A549 humanas. Las células alveolares humanas tipo A549 tipo II infectadas con SeV en condiciones de crecimiento de virus de una sola etapa (3 UFP/célula) y de etapas múltiples (0,01 UFP/célula) se trataron con diferentes concentraciones de NTZ o vehículo inmediatamente después del periodo de adsorción del virus. La producción de viriones (\circ) se determinó a las 24 (única etapa) o 48 (múltiples etapas) h p.i. por titulación de HA. La producción de viriones, expresado como porcentaje del control no tratado, representa la media \pm DE de las muestras cuadruplicadas. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$. La actividad antiviral de NTZ fue independiente del tipo de célula. De hecho, NTZ también fue eficaz en células alveolares de tipo II humanas infectadas con SeV. Los datos en la figura 12 son similares a los datos en la figura 5.

La figura 13 A-B muestra el efecto de la nitazoxanida en la síntesis de proteínas de SeV. (A) Autorradiografía de proteínas marcadas con [^{35}S]Met/Cys (pulso largo, 18 h iniciadas a las 6 h p.i.) de células AGMK infectadas de forma simulada (simulación) o infectadas con SeV (SeV) tratadas con NTZ 10 $\mu\text{g/ml}$, tunicamicina 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (TM) o vehículo (C) después de la adsorción de virus. Las proteínas virales están indicadas. (B) Autorradiografía de proteínas marcadas con [^{35}S]Met/Cys (pulso corto, 1 h) a las 24 h p.i. de células infectadas de forma simulada o infectadas con SeV tratadas como en (A). Muestras que contienen cantidades iguales de radiactividad (panel derecho, cpm) o cantidades iguales de proteínas (panel izquierdo, ml) se procesaron para SDS-PAGE y autorradiografía. Se encontró que las principales proteínas de SeV se sintetizaron en grandes cantidades en células no tratadas a las 24 h p.i. después de ambos pulsos largos (A, 18 h) y cortos (B, 1 h) con marcaje con [^{35}S]Met/Cys; no se detectaron cambios importantes en la síntesis de proteínas de SeV en las células tratadas con NTZ, con la excepción de la desaparición de una banda de aproximadamente 65-70 kDa de masa molecular, identificada posteriormente como la isoforma madura del precursor de la proteína de fusión F_0 (véase la figura 14). Los datos en la figura 13A-B son similares a los datos de la figura 7.

La figura 14A-B muestra el efecto de la nitazoxanida en la proteína de fusión de SeV. (A) Los niveles de proteína SeV-F se detectaron mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando un anticuerpo monoclonal SeV-F en diferentes momentos p.i. en células AGMK infectadas con SeV tratadas con NTZ 10 $\mu\text{g/ml}$, tunicamicina (TM) 2,5 $\mu\text{g/ml}$ o vehículo (C). Se muestra el control simulado de infección (simulación). Los niveles de α -tubulina en las mismas muestras se muestran como control de carga. (B) Autorradiografía de proteínas marcadas con [^{35}S]Met/Cys (1 h de pulso en diferentes momentos p.i.) de células AGMK infectadas de forma simulada (simulación) o infectadas con SeV tratadas con NTZ 10 $\mu\text{g/ml}$ o vehículo (C) después de la adsorción del virus. Las proteínas virales NP y F están indicadas. Los resultados confirman la ausencia de la proteína de fusión de SeV en las células tratadas con NTZ. Se mostraron resultados similares en células tratadas con TM. Los datos en la figura 14A-B son similares a los datos de la figura 8.

La figura 15A-B muestra que la nitazoxanida provoca la insolubilización de la proteína SeV-F. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western para SeV-F y β -actina en células AGMK infectadas de forma simulada o infectadas con SeV tratadas con NTZ 10 $\mu\text{g/ml}$, tunicamicina 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (TM) o vehículo (C) en presencia (+) o ausencia (-) del inhibidor del proteasoma bortezomib (Btz, 25 nM), o el inhibidor de la autofagia cloroquina (CQ, 20 ó 40 μM). (A) Se indican las fracciones solubles de los lisados celulares extraídos con tampón B (soluble) o los lisados celulares totales de muestras paralelas extraídas con el tampón de muestra de Laemmli (total). (B) Inmunotransferencia para SeV-F y β -actina de fracciones solubles e insolubles de extractos de células enteras extraídas con tampón B de células AGMK tratadas tal como se indica. Las fracciones insolubles se procesaron tal como se describe en Materiales y métodos. Fp indica la forma F de migración más rápida en las células tratadas con NTZ. La reducción del nivel de proteína F en las células tratadas con NTZ no la evitó el inhibidor del proteasoma bortezomib o el inhibidor de la autofagia cloroquina, lo que indica un efecto independiente de la degradación mediada por proteasoma o autofagia; en cambio, la proteína F se encontró en un estado insoluble en células tratadas con NTZ, lo que indica que una alteración en el procesamiento/maduración de la proteína podría conducir a la formación de agregados de proteína F presentes en un estado insoluble. Los datos en la figura 15A-B son similares a los datos de la figura 9.

La figura 16 proporciona evidencia de la presencia de grandes agregados de proteínas SeV-F en células tratadas con nitazoxanida. Microscopía inmunofocal de células AGMK infectadas de forma simulada (simulación) e infectadas con SeV tratadas con NTZ (10 $\mu\text{g/ml}$) o vehículo durante 24 h, marcadas con anticuerpos anti-calnexina (CNX, verde) y anti-SeV-F (rojo). Los núcleos se tiñen con DAPI (azul). Las imágenes se capturaron con el sistema de barrido de láser confocal Olympus Fluoview FV-1000. Se muestra la superposición de los tres fluorocromos (MERGE) y las

imágenes con aumento (barra, 7 μm). Los estudios de microscopía inmunofluorescencia confocal confirman la presencia de grandes agregados de proteína F en el RE de células tratadas con NTZ.

La figura 17 muestra que la nitazoxanida inhibe el transporte de glicoproteína SeV-F a la superficie celular. Se detectaron niveles de glicoproteínas de membrana plasmática SeV-F (rojo) a las 24 h p.i. por microscopía de inmunofluorescencia confocal en células AGMK infectadas con SeV tratadas con NTZ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o vehículo (SeV). Las células infectadas de forma simulada (simulación) se muestran como control. Los núcleos se tiñen con Hoechst (azul). Las imágenes se capturaron con el sistema de barrido de láser confocal Olympus Fluoview FV-1000. Se muestra la superposición de los dos fluorocromos (barra = 10 μm). La presencia de la proteína F no pudo detectarse en la superficie de la célula huésped de las células tratadas con NTZ, lo que confirma que la alteración en el procesamiento/maduración de la proteína F impide su transporte a la membrana celular.

La figura 18A-B muestra que la nitazoxanida provoca la insolubilización de la proteína F del virus Hendra (HeV) y del virus respiratorio sincicial (VRS). A. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western para HeV-F y α -tubulina de células HeLa simuladas transfectadas o transfectadas con el constructo de etiqueta HeV-F ORF C-Flag que expresa la proteína HeV-F, tal como se describe en Materiales y métodos, y tratadas con NTZ (C+) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tunicamicina 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (TM) o vehículo (C-). B. Análisis de inmunotransferencia de tipo Western para VRS-F y α -tubulina de células HeLa simuladas transfectadas o transfectadas con el constructo de etiqueta VRS-F ORF C-Flag que expresa la proteína VRS-F, tal como se describe en Materiales y métodos, y tratadas con NTZ (C+) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tunicamicina 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (TM) o vehículo (C-). A, B Se indican las fracciones solubles de lisados celulares extraídos con tampón B (soluble) o lisados celulares totales de muestras paralelas extraídas con tampón de muestra de Laemmli (total), tal como se describe en Materiales y métodos. Las proteínas HeV-F y VRS-F se detectaron usando anticuerpos anti-FLAG. Fp indica la forma F de migración más rápida en las células tratadas con TM. La proteína F de HeV y VRS se detectó principalmente en un estado insoluble en células tratadas con NTZ, lo que indica que, de manera similar a la proteína SeV-F, una alteración en el procesamiento/maduración de la proteína podría conducir a la formación de agregados de proteína F presentes en un estado insoluble.

La figura 19A-B muestra que la nitazoxanida inhibe el transporte de glicoproteína HeV-F y VRS-F a la superficie celular. A. Se detectaron niveles de glicoproteínas de la membrana plasmática de HeV-F (rojo) a las 24 h p.i. por microscopía de inmunofluorescencia confocal en células HeLa no permeabilizadas, transfectadas de forma simulada o transfectadas con el constructo de etiqueta HeV-F ORF C-Flag que expresa la proteína HeV-F, tal como se describe en Materiales y métodos, y tratadas con NTZ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o vehículo. B. Se detectaron niveles de glicoproteínas de membrana plasmática de VRS-F (rojo) a las 24 h p.i. por microscopía de inmunofluorescencia confocal en células HeLa no permeabilizadas, transfectadas de forma simulada o transfectadas con el constructo de etiqueta VRS-F ORF C-Flag que expresa la proteína VRS-F, tal como se describe en Materiales y métodos, y tratadas con NTZ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o vehículo. A, B Se detectaron las proteínas F usando anticuerpos anti-FLAG (rojo). Los núcleos se tiñen con Hoechst (azul). Las células transfectadas de forma simulada (simulación) se muestran como control. Las imágenes se capturaron con el sistema de barrido de láser confocal Olympus Fluoview FV-1000. Se muestra la superposición de los dos fluorocromos. La presencia de la proteína F se detectó en un nivel inferior en la superficie de la célula huésped de las células tratadas con NTZ, lo que indica que, de manera similar a la proteína SeV-F, la alteración en el procesamiento/maduración de la proteína F de HeV y VRS impide su transporte a la membrana celular. En el caso de infección por VRS, se descubrió que la nitazoxanida posee actividad antiviral contra VRS-A2 en células HeLa a dosis no citotóxicas, con una CI_{50} de 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y una CI_{90} de 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (para detalles de la infección por VRS véase Materiales y métodos). Los datos en la figura 19A-B son similares a los datos de la figura 10.

Descripción detallada

Documentos relacionados

Los siguientes documentos, todos incorporados por referencia, pueden ser útiles para comprender la presente divulgación: las patentes estadounidenses n.ºs 9.351.937; 9.126.992; 9.107.913; 9.023.877; 8.895.752; 8.846.727; 8.772.502; 8.633.230; 8.524.278; 8.124.632; 7.645.783; 7.550.493; 7.285.567; 6.117.894; 6.020.353; 5.968.961; 5.965.590; 5.935.591; 5.886.013; 5.859.038; 5.856.348; 5.387.598; las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.ºs 2015-025768; 2014-0065215; 2012-0294831; 2016-0243087; la publicación PCT n.º WO2016077420; J. Biol. Chem., 23 de octubre de 2009; 284 (43): 29798-29808; Antiviral Research, 110 (2014): 94-103; Biochim Biophys Acta., 11 de julio de 2003; 1614 (1): 73-84.

Definición de términos

A menos que se especifique lo contrario, "uno" o "una" significa "uno/una o más".

Tal como se usa en este documento, el término "infección viral" describe un estado patológico, en el que un virus invade una célula sana, usa la maquinaria reproductiva de la célula para multiplicarse o replicarse y finalmente lisar la célula, lo que da como resultado muerte celular, la liberación de partículas virales y la infección de otras células por los virus de progenie recién producidos. La infección latente por determinados virus también es un posible resultado

de una infección viral. Una infección viral aguda generalmente se caracteriza por un inicio rápido de una enfermedad, un periodo relativamente breve de síntomas y resolución en el plazo de días a algunas semanas. Suele acompañarse de la producción temprana de viriones infecciosos y la eliminación de la infección por el sistema inmunitario del huésped. Las infecciones virales agudas son responsables de epidemias de enfermedades que involucran a millones de personas cada año. Cuando las vacunas no están disponibles o no se usan, las infecciones agudas pueden ser difíciles de controlar, ya que un individuo infectado suele ser infeccioso antes de enfermarse. Esto hace que sea extremadamente difícil controlar las infecciones agudas en grandes poblaciones y áreas densamente pobladas, tales como universidades, residencias de ancianos, bases militares o barcos. Los niños, los ancianos y los individuos inmunodeprimidos son más susceptibles a las complicaciones de estas infecciones normalmente autolimitantes.

El término “una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus” puede referirse a una infección viral provocada por el virus y/o uno o más de sus síntomas, que pueden estar asociados con la infección viral.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar y/o prevenir una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus” puede incluir al menos uno de los siguientes: inhibir la replicación del virus, inhibir la transmisión viral, evitar que el virus se establezca en el huésped, mitigar o aliviar los síntomas o la progresión de la enfermedad provocada por el virus. El tratamiento se considera terapéutico si hay al menos uno de una reducción en la carga viral, disminución en la mortalidad y/o morbilidad relacionada con la enfermedad, disminución en la progresión de la enfermedad o una duración más corta de la enfermedad. En determinadas realizaciones, “tratar y/o prevenir una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus” puede incluir una mayor supervivencia entre los sujetos afectados con la enfermedad o estado provocado por o asociado con el virus de la gripe y tratados con un agente activo, tal como un compuesto de tiazolida, en comparación con sujetos afectados con la enfermedad o estado pero no tratados con el agente activo. En determinadas realizaciones, “tratar y/o prevenir una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus” puede incluir la reducción de una carga viral en un sujeto afectado con la enfermedad o estado provocado por o asociado con el virus administrando un agente activo. Sin embargo, en algunas realizaciones, “tratar y/o prevenir una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus” puede incluir mitigar o aliviar los síntomas o la progresión de la enfermedad provocada por el virus.

Divulgación

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los presentes inventores descubrieron que determinados compuestos de tiazolida pueden ser eficaces contra virus que pertenecen a las familias virales *Picornaviridae* y *Paramyxoviridae*.

En particular, tales compuestos pueden ser útiles para tratar o prevenir una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus que pertenece a la familia viral *Picornaviridae*.

FAMILIA VIRAL PICORNAVIRIDAE

La familia *Picornaviridae* es una familia viral (+)ARNmc. Los vertebrados, incluyendo los humanos, pueden servir como huéspedes naturales para los picornavirus. Actualmente hay 50 especies en esta familia, divididas entre 29 géneros. Los géneros de la familia *Picornaviridae* incluyen: género *Aphthovirus*, que incluye el virus de la rinitis bovina A, el virus de la rinitis bovina B, el virus de la rinitis equina A, el virus de la fiebre aftosa; género *Aquamavirus*, que incluye *Aquamavirus* A; género *Avihepatovirus*, que incluye el virus de la hepatitis A de pato; género *Cardiovirus*, que incluye virus de encefalomiocarditis, tilovirus, *Cosavirus*; género *Dicpivirus*, que incluye *cadivirus* A; género *Enterovirus*, que incluye enterovirus A-J y rinovirus A-C; género *Erbovirus*, que incluye el virus de la rinitis equina B; género *Hepatovirus*, que incluye el virus de la hepatitis A; género *Kobuvirus*, que incluye *Aichivirus* A, *Aichivirus* B y *Aichivirus* C; género *Megrivirus*, que incluye *Melegrivirus* A, parechovirus humano; virus de Ljungan; género *Piscevirus*, que incluye el picornavirus de Fathead minnow; género *Salivirus*, que incluye *Salivirus* A; género *Sapelovirus*, que incluye el sapelovirus porcino, sapelovirus del simio y sapelovirus aviar; género *Senecavirus*, que incluye el virus Seneca Valley; género *Teschovirus*, que incluye el teschovirus porcino; género *Tremovirus*, que incluye el virus de la encefalomiocarditis aviar. Las enfermedades asociadas con la familia *Picornaviridae* incluyen: parálisis (de tipo polio y no polio), resfriado estival, meningitis, diarrea provocada por enterovirus; fiebre aftosa (bovina) provocada por aftovirus; miocarditis provocada por *Cardiovirus*; resfriado común provocado por rinovirus; y hepatitis provocada por hepatovirus. Las enfermedades asociadas con la familia *Picornaviridae* incluyen: parálisis (de tipo polio y no polio), resfriado estival, meningitis, diarrea provocada por enterovirus; fiebre aftosa (bovina) provocada por aftovirus; miocarditis provocada por *Cardiovirus*; resfriado común provocado por *Rhinovirus*; y hepatitis provocada por *Hepatovirus*.

Género *Enterovirus*

El género *Enterovirus* incluye las siguientes doce especies: *Enterovirus* A, *Enterovirus* B, *Enterovirus* C, *Enterovirus* D, *Enterovirus* E, *Enterovirus* F, *Enterovirus* G, *Enterovirus* H, *Enterovirus* J, *Rhinovirus* A, *Rhinovirus* B, *Rhinovirus* C. Dentro de estas doce especies se encuentran los serotipos: 1) virus de Coxsackie: a) serotipos CV-A2, CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14 y CV-A16 encontrados bajo la especie *Enterovirus* A; b) serotipos CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6 y CV-A9 encontrados bajo la especie *Enterovirus* B; c) serotipos CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22 y CV-A24 encontrados bajo la

especie *Enterovirus C*; 2) serotipos de *Echovirus* E-1, E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9, E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32 y E-33 encontrados bajo la especie *Enterovirus B*; 3) *Enterovirus* a) tipos EV-A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-A114, EV-A119, SV19, SV43, SV46 y BA13 encontrados bajo la especie *Enterovirus A*; b) tipos EV-B69, EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 y SA5 encontrados bajo la especie *Enterovirus B*; c) tipos EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C116, EV-C117 y EV-C118 encontrados bajo la especie *Enterovirus C*; d) tipos EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 y EV-D120 encontrados bajo la especie *Enterovirus D*; e) tipos: EV-H1 encontrado bajo la especie *Enterovirus H*; f) tipos: SV6, EV-J103, EV-J108, EV-J112, EV-J115 y EV-J121 encontrados bajo la especie *Enterovirus J*; 4) rinovirus humano a) tipos HRV-A1, HRV-A2, HRV-A7, HRV-A8, HRV-A9, HRV-A10, HRV-A11, HRV-A12, HRV-A13, HRV-A15, HRV-A16, HRV-A18, HRV-A19, HRV-A20, HRV-A21, HRV-A22, HRV-A23, HRV-A24, HRV-A25, HRV-A28, HRV-A29, HRV-A30, HRV-A31, HRV-A32, HRV-A33, HRV-A34, HRV-A36, HRV-A38, HRV-A39, HRV-A40, HRV-A41, HRV-A43, HRV-A44, HRV-A45, HRV-A46, HRV-A47, HRV-A49, HRV-A50, HRV-A51, HRV-A53, HRV-A54, HRV-A55, HRV-A56, HRV-A57, HRV-A58, HRV-A59, HRV-A60, HRV-A61, HRV-A62, HRV-A63, HRV-A64, HRV-A65, HRV-A66, HRV-A67, HRV-A68, HRV-A71, HRV-A73, HRV-A74, HRV-A75, HRV-A76, HRV-A77, HRV-A78, HRV-A80, HRV-A81, HRV-A82, HRV-A85, HRV-A88, HRV-A89, HRV-A90, HRV-A94, HRV-A95, HRV-A96, HRV-A98, HRV-A100, HRV-A101, HRV-A102 y HRV-A103 encontrados bajo la especie *Rhinovirus A*; b) tipos HRV-B3, HRV-B4, HRV-B5, HRV-B6, HRV-B14, HRV-B17, HRV-B26, HRV-B27, HRV-B35, HRV-B37, HRV-B42, HRV-B48, HRV-B52, HRV-B69, HRV-B70, HRV-B72, HRV-B79, HRV-B83, HRV-B84, HRV-B86, HRV-B91, HRV-B92, HRV-B93, HRV-B97 y HRV-B99 encontrados bajo la especie *Rhinovirus B*; c) tipos HRV-C1, HRV-C2, HRV-C3, HRV-C4, HRV-C5, HRV-C6, HRV-C7, HRV-C8, HRV-C9, HRV-C10, HRV-C11, HRV-C12, HRV-C13, HRV-C14, HRV-C15, HRV-C16, HRV-C17, HRV-C18, HRV-C19, HRV-C20, HRV-C21, HRV-C22, HRV-C23, HRV-C24, HRV-C25, HRV-C26, HRV-C27, HRV-C28, HRV-C29, HRV-C30, HRV-C31, HRV-C32, HRV-C33, HRV-C34, HRV-C35, HRV-C36, HRV-C37, HRV-C38, HRV-C39, HRV-C40, HRV-C41, HRV-C42, HRV-C43, HRV-C44, HRV-C45, HRV-C46, HRV-C47, HRV-C48, HRV-C49, HRV-C50 y HRV-C51 encontrados bajo la especie *Rhinovirus C*; 5) serotipos de poliovirus PV-1, PV-2 y PV-3 encontrados bajo la especie *Enterovirus C*.

Los virus de *Coxsackie A* se asocian principalmente con la fiebre aftosa humana. Los virus de *Coxsackie B* pueden provocar signos y síntomas, similares a un "resfriado", pero estos virus también pueden provocar enfermedades más graves, tales como la miocarditis (inflamación del corazón); pericarditis (inflamación del saco que reviste el corazón); meningitis (inflamación de las membranas que revisten el cerebro y la médula espinal); y pancreatitis (inflamación del páncreas). Los *Echovirus* son la causa de muchas de las infecciones virales inespecíficas. Se encuentra principalmente en el intestino y puede provocar trastornos nerviosos. Los síntomas habituales de *Coxsackie* y *Echovirus* son fiebre, erupción cutánea leve y enfermedad leve de las vías respiratorias altas (VRA).

Las enfermedades provocadas por virus que pertenecen al género *Enterovirus* incluyen, pero no se limitan a, poliomielitis; síndrome de tipo poli; enfermedad febril inespecífica, que puede tener uno o más de los siguientes síntomas: fiebre, dolor muscular, dolor de garganta, molestia gastrointestinal/malestar abdominal y cefalea; meningitis séptica; enfermedad de Bornholm o pleurodinia epidémica, que puede caracterizarse por uno o más de los siguientes síntomas: dolor paroxístico intenso en el pecho y abdomen, fiebre, náuseas, cefalea y emesis; pericarditis y/o miocarditis, que puede tener uno o más de los siguientes síntomas: fiebre, disnea y dolor en el pecho; conjuntivitis hemorrágica aguda; herpangina, que puede involucrar uno o más de los siguientes síntomas: erupción vesicular en la cavidad oral y en la faringe, fiebre alta, dolor de garganta, malestar general, disfagia, pérdida de apetito, dolor de espalda y cefalea; fiebre aftosa humana.

FAMILIA VIRAL *PARAMYXOVIRIDAE*

La familia *Paramyxoviridae* es una familia viral (-)ARNmc. Los humanos, los vertebrados y las aves sirven como huéspedes naturales para los paramixovirus. Actualmente hay 36 especies en esta familia, divididas entre 18 géneros. Las enfermedades asociadas con la familia *Paramyxoviridae* incluyen: sarampión, paperas, infecciones de las vías respiratorias. *Paramyxoviridae* se divide en dos subfamilias, *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. Los géneros de la familia *Paramyxoviridae* incluyen: género *Aquaparamyxovirus*, que incluye paramixovirus de salmón del Atlántico; género *Avulavirus*, que incluye paramixovirus aviar 1-12, paramixovirus de ganso y virus de la enfermedad de Newcastle; género *Ferlavirus*, que incluye paramixovirus Fer-de-Lance; género *Henipavirus*, que incluye el virus Hendra, el virus Nipah y el virus Cedar; género *Morbillivirus*, que incluye el virus del moquillo canino, el virus de la catecean morbillius, el virus del sarampión, el virus de la peste de pequeños rumiantes, el virus del moquillo de las focas, el virus de la peste bovina; género *Respirovirus*, que incluye el virus Sendai, el virus paragripal humano tipo 1 y el virus paragripal humano tipo 3; género de *Rubulavirus*, que incluye virus de las paperas, virus paragripal humano tipo 2 y virus paragripal humano tipo 4; virus similares a paramixovirus Tupaia (TPMV); género *Metapneumovirus*, que incluye metapneumovirus aviar y metapneumovirus humano; género *Neumovirus*, que incluye el virus respiratorio sincicial humano (VRSB), el virus respiratorio sincicial bovino, el virus respiratorio sincicial ovino, el virus respiratorio sincicial caprino, el virus de la neumonía de ratones.

Los henipavirus, tales como el virus Hendra, el virus Nipah y el virus Cedar, pueden provocar una enfermedad o incluso la muerte en animales domésticos, incluyendo equinos, felinos, cerdos, así como en humanos.

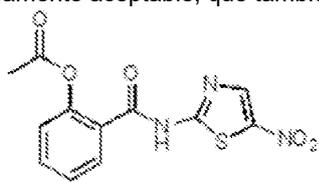
La familia *Paramyxoviridae* incluye los virus paragripales humanos (HPIV) tipos 1-4. HPIV-1 puede ser una causa de laringitis aguda, también conocida como laringotraqueobronquitis, que es un tipo de infección respiratoria. La infección puede provocar hinchazón dentro de la tráquea, lo que interfiere con la respiración normal y produce los síntomas clásicos de tos "ladradora", estridor y voz ronca. También pueden estar presentes fiebre y secreción nasal. El HPIV-2 también puede ser una causa de laringitis aguda como causa de otras enfermedades de las vías respiratorias altas y bajas. HPIV-3 puede ser una causa de bronquiolitis y neumonía. HPIV-3 puede afectar principalmente a niños pequeños, tales como los menores de 1 año. La bronquiolitis es la inflamación de los bronquiolos, los conductos de aire más pequeños de los pulmones. Se presenta con tos, respiración con silbido y/o falta de aliento que puede provocar dificultad para alimentar a algunos niños. La neumonía es una afección inflamatoria del pulmón que afecta principalmente a los sacos alveolares microscópicos conocidos como alvéolos. Los signos y síntomas típicos incluyen una gravedad variable y una combinación de tos productiva o seca, dolor de pecho, fiebre y dificultad para respirar, dependiendo de la causa subyacente.

El virus Sendai (SeV), también conocido como virus paragripal murino tipo 1 o virus de la hemaglutinación de Japón (HVJ), es responsable de una infección altamente transmisible de las vías respiratorias en ratones, hámsteres, cobayas, ratas y ocasionalmente cerdos. Los síntomas de la infección provocada por el virus Sendai incluyen estornudos, postura encorvada, dificultad respiratoria, secreción de porfirina en los ojos y/o la nariz, letargo, falta de crecimiento en bebés y ratas jóvenes supervivientes, anorexia.

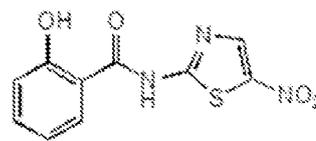
Los virus que pertenecen al género *Pneumovirus*, tales como el virus respiratorio sincicial humano, pueden provocar varias enfermedades relacionadas con enfermedades respiratorias, que pueden ir desde una enfermedad respiratoria de las vías altas menos grave hasta una bronquiolitis grave o neumonía. Los síntomas de tales enfermedades pueden incluir síntomas leves tales como rinitis, tos y disminución del apetito y síntomas más graves, tales como sibilancias, dificultad para respirar, fiebre, bronquiolitis y neumonía.

En algunas realizaciones, un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede reducir la duración de los síntomas provocados por o asociados con el virus respiratorio sincicial humano. Por ejemplo, un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede reducir la duración de los síntomas provocados por o asociados con el virus respiratorio sincicial humano en al menos 12 horas o al menos 24 horas o al menos 36 horas o al menos 48 horas o al menos 60 horas o al menos 72 horas o al menos 84 horas o al menos 96 horas o al menos 108 horas o al menos 120 horas o al menos 132 horas o al menos 144 horas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la duración de los síntomas provocados por o asociados con el virus respiratorio sincicial humano puede reducirse desde 12 horas hasta 144 horas o desde 24 horas hasta 132 horas o desde 36 horas hasta 120 horas o desde 48 horas hasta 108 horas o desde 60 horas hasta 96 horas o desde 66 horas hasta 90 horas, desde 72 horas hasta 84 horas o cualquier subintervalo o valor dentro de estos intervalos.

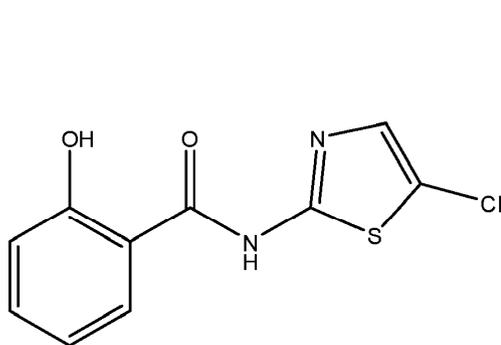
En algunas realizaciones, el compuesto de tiazolida puede ser nitazoxanida (1, véase la fórmula a continuación) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La nitazoxanida es un producto autorizado en los Estados Unidos para el tratamiento de la gastroenteritis infecciosa. En algunas realizaciones, el compuesto de tiazolida puede ser tizoxanida o su sal farmacéuticamente aceptable, que también se muestra a continuación.



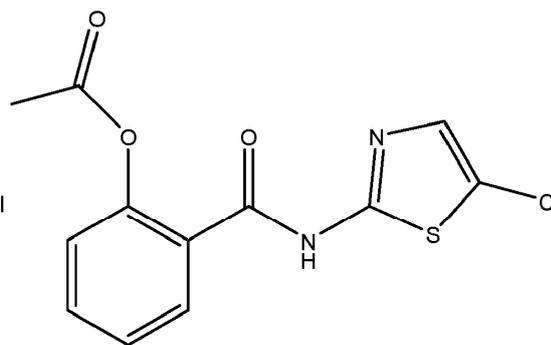
(NTZ, 1)



(TIZ, 2)



RM-4848



RM-5038

En algunas realizaciones, la nitazoxanida y la tizoxanida pueden usarse juntas como una combinación.

5 En algunas realizaciones, el compuesto de tiazolida puede ser RM-4848, que es una tiazolida sustituida que tiene la misma estructura que la tizoxanida, pero que incluye un grupo cloro sustituido por el grupo nitro, dando como resultado el compuesto N-(5-clorotiazol-2-il)-2-hidroxibenzamida. En algunas realizaciones, el compuesto de tiazolida puede ser RM-5038, que es un profármaco de éster de RM-4848. RM-4848 y RM-5038 se divulgan, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20120294831.

10 Los compuestos de tiazolida pueden sintetizarse, por ejemplo, según procedimientos publicados de las patentes estadounidenses n.ºs 3.950.351 y 6.020.353, PCT WO2006042195A1 y US2009/0036467A. Otros compuestos de tiazolida adecuados se divulgan en las patentes estadounidenses n.ºs 7.645.783, 7.550.493, 7.285.567, 6.117.894, 6.020.353, 5.968.961, 5.965.590, 5.935.591 y 5.886.013.

15 En algunas realizaciones, cuando se usa contra un virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*, tal como un virus que pertenece al género *Enterovirus*, el compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede administrarse junto con un agente antiviral de acción directa que inhibe la replicación de los virus que pertenecen a la familia *Picornaviridae*.

20 Los agentes antivirales de acción directa incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la proteasa 3C, tales como rupintrivir, pirazoles 17 y 18, e inhibidores análogos de nucleósidos, tales como MK-0608. Preferiblemente, un agente antiviral de acción directa se administra en una cantidad eficaz, que es una cantidad necesaria para lograr un efecto deseado cuando el agente antiviral de acción directa se usa junto con un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida.

25 Un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/tizoxanida, puede administrarse de manera concurrente o posterior con un inhibidor de neuraminidasa.

30 Cuando un virus pertenece al género *Enterovirus*, la administración de un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, solo o junto con un agente antiviral de acción directa puede aliviar al menos un síntoma de una enfermedad o estado provocado por o asociado con tales virus, cuyo síntoma puede ser, por ejemplo, fiebre, tos, dolor de garganta, obstrucción nasal, fatiga, cefalea, mialgia y/o febrilidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando un virus pertenece al género *Enterovirus*, la administración de un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, solo o junto con un agente antiviral de acción directa puede a) reducir la fiebre provocada por o asociada con una enfermedad o estado provocado por o asociado con dicho virus y b) aliviar al menos un síntoma de la enfermedad o estado, que puede ser, por ejemplo, tos, dolor de garganta, obstrucción nasal, fatiga, cefalea, mialgia y/o febrilidad. En algunas realizaciones, la administración de un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, solo o junto con un inhibidor de neuraminidasa, tal como oseltamivir, puede a) reducir la fiebre provocada por o asociada con la enfermedad o estado, y b) aliviar al menos un síntoma respiratorio provocado por o asociado con la enfermedad o estado y al menos un síntoma constitucional asociado con la enfermedad o estado, en el que el al menos un síntoma respiratorio se selecciona de tos, dolor de garganta y/u obstrucción nasal y el al menos un síntoma constitucional se selecciona de fatiga, cefalea, mialgia y febrilidad.

45 El término "sal" puede usarse en su sentido más amplio. Por ejemplo, el término "sal" incluye sales de hidrógeno y sales de hidróxido con iones del presente compuesto. En algunas realizaciones, el término sal puede ser una subclase denominada sales farmacéuticamente aceptables, que son sales de los presentes compuestos que tienen una actividad farmacológica y que no son biológicamente ni de otro modo indeseables. En todas las realizaciones, las sales pueden formarse con ácidos, tales como, sin limitación, hidrógeno, haluros, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, tiocianato, tosilato y undecanoato. En todas las realizaciones, las sales pueden formarse con bases, tales como, sin limitación, hidróxido, sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de litio, sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio, magnesio, sales de aluminio, sales con bases orgánicas tales como amoniaco, metilamina, dietilamina, etanolamina, dicitlohexilamina, N-metilmorfolina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina y lisina. Los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con agentes que incluyen haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; y haluros de aralquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo. Los términos "sal terapéuticamente aceptable" y "sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, representan tanto sales como formas zwitteriónicas de los compuestos de la presente invención que son solubles en agua o en aceite o dispersables; que son adecuados para el tratamiento de enfermedades sin toxicidad excesiva, irritación y respuesta alérgica; que son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable; y que son eficaces para su uso previsto. Las sales pueden prepararse durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos o por separado haciendo reaccionar el compuesto apropiado en forma de base libre con un ácido adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, L-ascorbato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato (besilato), bisulfato, butirato,

5 alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, digluconato, formiato, fumarato, gentisato, glutarato, glicerofosfato, glicolato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hipurato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isetionato), lactato, maleato, malonato, DL-mandelato, mesitilenosulfonato, metanosulfonato, naftilenosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfonato, picrato, pivalato, propionato, piroglutamato, succinato, sulfonato, tartrato, L-tartrato, tricloroacetato, trifluoroacetato, fosfato, glutamato, bicarbonato, para-toluenosulfonato (p-tosilato) y undecanoato. Además, los grupos básicos en los compuestos de la presente invención pueden cuaternizarse con cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y esterilo; y bromuros de bencilo y fenetilo. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición terapéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como oxálico, maleico, succínico y cítrico. Las sales también pueden formarse mediante la coordinación de los compuestos con un metal alcalino o un ion alcalinotérreo. Por tanto, la presente invención contempla sales de sodio, potasio, magnesio y calcio de los compuestos de los compuestos de la presente invención y similares.

15 Las sales de adición básicas pueden prepararse durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos haciendo reaccionar un grupo carboxilo, fenol o similar con una base adecuada tal como un hidróxido metálico, carbonato o bicarbonato, o con amoníaco o una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica. Los cationes de sales terapéuticamente aceptables incluyen litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, así como cationes de amina cuaternaria no tóxicos tales como amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina, tributilamina, tributilamina, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, diciohexilamina, procaína, dibencilamina, N,N-dibencilfeniletilamina, 1-efenamina y N,N'-dibenciletidiamina. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina y piperazina.

25 En algunas realizaciones, el compuesto de tiazolida puede administrarse como parte de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede incluir además del compuesto de tiazolida un portador, tal como un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador" puede usarse en su sentido más amplio. Por ejemplo, el término "portador" se refiere a cualquier portador, diluyente, excipiente, agente humectante, agente de tamponamiento, agente de suspensión, agente lubricante, adyuvante, vehículo, sistema de administración, emulsionante, disgregante, absorbente, conservante, tensioactivo, colorante, saborizante y edulcorante. En algunas realizaciones, el portador puede ser un portador farmacéuticamente aceptable, un término más estrecho que el portador, ya que el término portador farmacéuticamente aceptable significa uno no tóxico que sería adecuado para su uso en una composición farmacéutica. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variar para administrar una cantidad del/de los compuesto(s) activo(s) que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular.

40 El nivel de dosis seleccionado puede depender de la actividad del compuesto de tiazolida, la vía de administración, la gravedad del estado que está tratándose y el estado y la historia médica previa del paciente que está tratándose. Sin embargo, está dentro de la habilidad de la técnica comenzar las dosis del/de los compuesto(s) a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz se puede dividir en dosis múltiples con fines de administración, por ejemplo, de dos a cuatro dosis por día. Sin embargo, se entenderá que el nivel de dosis específico para un paciente en particular puede depender de una variedad de factores, que incluyen el peso corporal, la salud general, la dieta, el momento y la vía de administración y la combinación con otros agentes terapéuticos y la gravedad del estado o enfermedad que está tratándose.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía sistémica, por ejemplo, en una formulación oral, tal como una formulación oral sólida. Por ejemplo, puede tener la forma física de un polvo, comprimido, cápsula, pastilla para chupar, gel, disolución, suspensión, jarabe o similares. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede estar en forma de una formulación divulgada en las patentes estadounidenses n.ºs 8.524.278 y 9.351.937. Tal formulación puede, por ejemplo, incluir una porción de liberación controlada, que incluye un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida; y una porción de liberación inmediata, que contiene un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida. Estas composiciones pueden administrarse en una dosis única o en dosis múltiples que se administran en diferentes momentos.

55 En algunas realizaciones, la cantidad total de un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, en la composición puede ser de aproximadamente el 60% al 75% en peso de la composición. La composición puede formularse para liberación inmediata, liberación controlada o liberación sostenida. Las composiciones pueden contener uno o más aditivos o excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales. Estos excipientes son componentes terapéuticamente inertes que son bien conocidos y apreciados en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término "componente inerte" puede referirse a aquellos componentes terapéuticamente inertes que son bien conocidos en la técnica de fabricación farmacéutica, que pueden usarse solos o en diversas combinaciones, e incluyen, por ejemplo, diluyentes, disgregantes, aglutinantes, agentes de suspensión, deslizantes, lubricantes, cargas, agentes de recubrimiento, agentes solubilizantes, agentes edulcorantes, agentes colorantes, agentes saborizantes y antioxidantes. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pa.

Los ejemplos de diluyentes o cargas incluyen, pero no se limitan a, almidón, lactosa, xilitol, sorbitol, azúcar de repostería, azúcar comprimible, dextratos, dextrina, dextrosa, fructosa, lactitol, manitol, sacarosa, talco, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico o tribásico, fosfato dicálcico deshidratado, sulfato de calcio y similares. La cantidad de diluyentes o cargas puede estar en un intervalo de entre aproximadamente el 2% y aproximadamente el 15% en peso de toda la composición. Los ejemplos de disgregantes incluyen, pero no se limitan a, ácido algínico, ácido metacrílico DVB, PVP reticulado, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polacrilina de potasio, glicolato de sodio y almidón, incluyendo almidón de maíz, almidón pregelatinizado y similares. El/los disgregante(s) representa(n) normalmente de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 15% en peso de toda la composición.

Los ejemplos de aglutinantes incluyen, pero no se limitan a, almidones tales como almidón de patata, almidón de trigo, almidón de maíz; celulosa microcristalina; celulosas tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), etilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio; gomas naturales tales como goma arábiga, ácido algínico, goma guar; glucosa líquida, dextrina, povidona, jarabe, poli(óxido de etileno), polivinilpirrolidona, poli-N-vinilamida, polietilenglicol, gelatina, polipropilenglicol, tragacanto y similares. La cantidad de aglutinante(s) es de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 14% en peso de toda la composición.

Los ejemplos de deslizantes incluyen, pero no se limitan a, dióxido de silicio, sílice coloidal anhidra, trisilicato de magnesio, fosfato de calcio tribásico, silicato de calcio, silicato de magnesio, dióxido de silicio coloidal, celulosa en polvo, almidón, talco y similares. La cantidad de deslizante(s) es de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,3% en peso de toda la composición.

Los ejemplos de lubricantes incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de aluminio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico, polietilenglicol, behenato de glicerilo, aceite mineral, fumarato de estearil de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado y similares. La cantidad de lubricante(s) es de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 1,0% en peso de toda la composición.

Las composiciones pueden contener un aglutinante que es un polímero de baja viscosidad. Los ejemplos de polímeros de baja viscosidad incluyen, pero no se limitan a, polímeros de hidroxipropilmetilcelulosa de baja viscosidad, tales como los comercializados por Dow Chemical con el nombre comercial "Methocel™" (por ejemplo, Methocel E50LV™, Methocel K100LVR™ y Methocel F50LVR™) y polímeros de hidroxietilcelulosa de baja viscosidad. El polímero de baja viscosidad está normalmente presente a de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20%, o de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 15%, o preferiblemente de aproximadamente el 12%, del peso total de toda la composición, o, en aquellas realizaciones que tienen liberación controlada y porciones de liberación inmediata, el polímero de baja viscosidad en la porción de liberación controlada está normalmente presente en de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 20%, preferiblemente de aproximadamente el 18%, del peso de la porción de liberación controlada.

Las composiciones pueden comprender además un material de recubrimiento. El material de recubrimiento está normalmente presente como una capa externa en la forma de dosificación que cubre completamente la formulación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la forma de dosificación es un comprimido oral en el que la porción de liberación controlada forma una primera capa del comprimido y la porción de liberación inmediata forma una segunda capa que se deposita en la parte superior de la primera capa para formar un comprimido de núcleo. En tales realizaciones, por ejemplo, el material de recubrimiento puede estar en forma de una capa de recubrimiento externa que se deposita en la parte superior del comprimido de núcleo. El material de recubrimiento normalmente es de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% en peso de la composición, y puede comprender hidroxipropilmetilcelulosa y/o polietilenglicol, y uno o más excipientes seleccionados del grupo que comprende agentes de recubrimiento, opacificantes, agentes para enmascarar el sabor, cargas, agentes de pulido, agentes colorantes, agentes antiadherentes y similares. Los expertos en la técnica conocen bien ejemplos de sustancias de recubrimiento de película y métodos para usar tales sustancias de recubrimiento.

La composición que comprende un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede administrarse durante un periodo de tiempo adecuado para tratar eficazmente una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*, tal como un virus que pertenece al género *Enterovirus*. Pueden usarse varias dosis y regímenes apropiados para las composiciones. En algunas realizaciones, la administración puede llevarse a cabo durante un periodo de aproximadamente 3 días a aproximadamente 104 semanas. En algunas realizaciones, la administración puede llevarse a cabo durante un periodo superior a 104 semanas e incluso puede llevarse a cabo indefinidamente. Los regímenes apropiados pueden determinarlos un médico.

En algunas realizaciones, la administración de un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede comenzar en el plazo de 24 horas o en el plazo de 36 horas o en el plazo de 48 horas o en el plazo de 60 horas o en el plazo de 72 horas o en el plazo de 96 horas desde la aparición en un paciente, tal como un ser humano, de al menos un síntoma de una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*, tal como un virus que pertenece al género *Enterovirus*. Por ejemplo, para un virus que pertenece al género *Enterovirus*, la administración de un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede

comenzar en el plazo de 24 horas o en el plazo de 36 horas o en el plazo de 48 horas o en el plazo de 60 horas o en el plazo de 72 horas o en el plazo de 96 horas desde la aparición en un paciente, tal como un ser humano, de al menos un síntoma de una enfermedad o estado provocado por o asociado con tal virus, que puede ser, por ejemplo, fiebre, tos, dolor de garganta, obstrucción nasal, fatiga, cefalea, mialgia y febrilidad.

En algunas realizaciones, una dosis diaria de un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, administrada a un humano puede ser de desde 100 mg hasta 1300 mg o desde 200 mg hasta 1200 mg o desde 250 mg hasta 1100 mg o desde 300 mg hasta 1000 mg o cualquier valor de dosis o subintervalo dentro de estos intervalos. Los valores de dosificación a modo de ejemplo incluyen 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg u 800 mg.

En algunas realizaciones, un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede administrarse al menos durante 2 días o al menos durante 3 días o al menos durante 4 días o al menos durante 5 días o al menos durante 6 días. En algunas realizaciones, un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede administrarse durante un periodo de desde 2 hasta 14 días o desde 3 hasta 10 días o desde 4 hasta 7 días o cualquier valor o subintervalo dentro de estos intervalos. En determinadas realizaciones, un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede administrarse durante 5 días. La dosis del compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede ser de desde 300 mg hasta 900 mg o desde 400 mg hasta 800 mg o desde 500 mg hasta 700 mg o cualquier valor de dosis o intervalo dentro de estos intervalos. Los valores de dosificación a modo de ejemplo incluyen 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg u 800 mg. El compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede administrarse una, dos o tres veces al día. En determinados casos, pueden administrarse 600 mg de nitazoxanida y/o tizoxanida dos veces al día. El compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida, puede administrarse conjuntamente con un agente antiviral de acción directa, contra *Picornaviridae*, tal como rupintrivir o MK-0608. Una dosis del agente antiviral de acción directa puede variar. El agente antiviral de acción directa, tal como rupintrivir, MK-0608 o GS-5806, puede administrarse conjuntamente una vez, dos o tres veces al día. En determinados casos, pueden administrarse 600 mg de nitazoxanida y/o tizoxanida dos veces al día junto con una cantidad eficaz del antiviral de acción directa administrado dos veces al día.

Puede administrarse un compuesto de tiazolida a un sujeto afectado por un virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*, tal como un virus que pertenece al género *Enterovirus*. Tal sujeto puede ser un animal, incluyendo un ser humano.

Preferiblemente, un compuesto de tiazolida, tal como nitazoxanida y/o tizoxanida se administra a un sujeto afectado por un virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*, tal como un virus que pertenece al género *Enterovirus* en una cantidad eficaz, lo que puede significar la cantidad necesaria para lograr el efecto deseado. Las realizaciones descritas en el presente documento se ilustran adicionalmente mediante los siguientes ejemplos de trabajo.

Ejemplos

La familia *Paramyxoviridae* comprende muchos patógenos virales humanos importantes, incluyendo el sarampión, las paperas, el virus paragripal, el VRS (virus respiratorio sincicial), los metapneumovirus y los henipavirus, que provocan algunas de las zoonosis emergentes más letales. La falta de una terapia antiviral eficaz subraya la necesidad de nuevos fármacos eficaces contra estos virus. Anteriormente se demostró que la nitazoxanida (NTZ), una tiazolida segura, biodisponible por vía oral, autorizada en los EE.UU. para el tratamiento de infecciones por *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*, tiene actividad antiviral contra los virus de la gripe. En el presente documento se investigó la actividad de NTZ y una clase de tiazolidas de segunda generación (SGT), RM-4848 y RM-5038 contra la infección por *Paramyxoviridae* *in vitro* usando el virus Sendai (SeV) y VRS-A2 como modelos, y se exploró el mecanismo de la acción antiviral. La producción de viriones se determinó mediante valoración de hemaglutinina y ensayo de infectividad en células de mono y humanas; la viabilidad celular se determinó mediante ensayo MTT. La síntesis/maduración de proteínas virales se caracterizó por SDS/PAGE-autorradiografía después de marcaje con [³⁵S]metionina, inmunoprecipitación y/o digestión con EndoH, y mediante inmunofluorescencia y análisis de inmunotransferencia de tipo Western en células infectadas o en células transfectadas transitoriamente con proteína de fusión (F) del virus de Hendra marcado con FLAG.

NTZ y SGT mostraron una notable actividad antiviral contra SeV, reduciendo la producción de viriones de forma dependiente de la dosis con un SI que oscila desde > 50 hasta > 625 dependiendo de la m.o.i. (*multiplicity of infection*), y protegiendo las células huésped del daño inducido por el virus. Los tiazolidas no afectaron la entrada del virus ni provocaron una inhibición general de la síntesis de proteínas virales, mientras que inhibieron la maduración y la translocación intracelular de las glicoproteínas HN y F virales. En particular, NTZ también causó una disminución en los niveles intracelulares de la proteína F, que juega un papel crítico en la fusión celular y la infectividad del virión. Este efecto no se debió a la degradación de la proteína a través del sistema ubiquitina-proteasoma o la autofagia, ya que no se pudo rescatar mediante el tratamiento con el inhibidor del proteasoma bortezomib o el inhibidor de la autofagia cloroquina. En cambio, se encontró que la proteína SeV-F estaba presente en un estado insoluble en las células tratadas con NTZ, lo que sugiere que un defecto inducido por el fármaco en la maduración conduciría a la agregación de la proteína F. Curiosamente, los tiazolidas afectaron de manera similar a la proteína F del virus Hendra en células que expresan transitoriamente HeV-F marcado con FLAG en ausencia de infección viral, lo que sugiere un

mecanismo mediado por células. Los resultados indican que NTZ es eficaz contra la infección por *Paramyxovirus*, actuando a nivel posterior a la entrada mediante un nuevo mecanismo que selecciona como diana glicoproteínas virales. El tratamiento con NTZ también fue eficaz contra el VRS, lo que sugiere un efecto general del fármaco sobre miembros de la familia *Paramyxoviridae*. Resultados del estudio presentado en las figuras 4-19.

5

Materiales y métodos

Cultivo, tratamiento y transfecciones celulares. Se cultivaron células epiteliales alveolares humanas similares a A549 tipo II y células HeLa de carcinoma de cuello uterino, y células de riñón de mono verde africano (AGMK, línea celular 37RC) a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂ en medio RPMI (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) (AGMK, A549), o medio DMEM (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) (HeLa), complementado con suero bovino fetal al 10% (FCS), glutamina 2 mM y antibióticos. Se diluyeron nitazoxanida (NTZ), tizoxanida (TIZ) (Romark Laboratories, LC), inhibidor de la glicosilación tunicamicina (TM), inhibidor del proteasoma bortezomib e inhibidor de la autofagia cloroquina, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disuelto en disolución madre DMSO (25 mg/ml) en medio de cultivo y se añadieron a las células infectadas inmediatamente después de un periodo de adsorción de una hora, a menos que se especifique lo contrario. Los compuestos se mantuvieron en el medio durante la duración del experimento. Los controles recibieron cantidades iguales de vehículo DMSO, lo que no afectó la viabilidad celular o la replicación del virus. Cada concentración de cada compuesto se sometió a prueba por duplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces. Para los experimentos de transfección, las monocapas semiconfluentes de células HeLa se transfectaron transitoriamente con un constructo impulsado por pCMV que contiene el gen que expresa la proteína F del virus respiratorio sincicial humano (VRS, subtipo A, cepa A2) unido a una etiqueta FLAG (etiqueta VRS-F ORF C-Flag, Sino Biological Inc.), un constructo impulsado por pCMV que contiene el gen que expresa la proteína F del virus Hendra (HeV) unido a una etiqueta FLAG (etiqueta HeV-F ORF C-Flag, Sino Biological Inc.), o el vector pcDNA3 como control. Las transfecciones se realizaron usando el reactivo de transfección jetPRIME (transfección Polyplus), según las instrucciones del fabricante.

Citotoxicidad La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de conversión de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en MTT formazán (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Para el ensayo MTT, se extrajo MTT reducido (formazán) de las células mediante la adición de 100 µl de isopropanol ácido que contenía Triton X-100 al 10%, y se midió la absorbancia de formazán en un lector de microplacas ELISA a dos longitudes de onda diferentes (540 y 690 nm). La dosis letal del 50% (DL₅₀) se calculó usando el software Prism 5.0 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA). El examen microscópico de las células infectadas de forma simulada o infectadas con virus se realizó diariamente para detectar el efecto citopático inducido por virus y los posibles cambios morfológicos y/o citoprotección inducida por el fármaco. Los estudios de microscopía se realizaron con un microscopio Leica DM-IL y las imágenes se capturaron en una cámara Leica DC 300 con el software Leica Image-Manager500. Preparación, infección y titulación del virus. El virus Sendai (SeV) se cultivó en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 10 días. Después de 48 h a 37°C, el líquido alantoideo se recogió y se centrifugó a 5.000 rpm durante 30 minutos para retirar residuos celulares, y los títulos de virus se determinaron mediante valoración de hemaglutinina (HA) y ensayo en placa, según procedimientos convencionales (Bernasconi *et al.*, 2005, Pica *et al.*, 2000).

Para la infección viral, se infectaron monocapas de células AGMK confluentes con SeV durante 1 hora a 37°C a una multiplicidad de infección (MOI) de 3 UFP (unidad de formación de placa)/célula, a menos que se especifique de manera diferente. Se utilizaron condiciones similares para la infección de células A549 humanas. Después del periodo de adsorción, se retiró el inóculo viral y las monocapas celulares se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se mantuvieron a 37°C en medio de cultivo RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 2%. Para curvas de crecimiento de virus de múltiples etapas, se infectaron monocapas de células AGMK/A549 confluentes con SeV durante 1 h a 37°C a una MOI de 0,01 UFP/célula. Después del periodo de adsorción de 1 h, se retiró el inóculo viral y las monocapas celulares se lavaron tres veces con PBS. Las células se mantuvieron a 37°C en medio de cultivo RPMI 1640 que contenía albúmina sérica bovina al 0,5% (BSA) y tripsina tratada con L-1-tosilamida-2-feniletilclorometilcetona (TPCK) (1 µg/ml) (Sigma-Aldrich). La producción de viriones se determinó 24 y 48 h después de la infección (p.i.) mediante valoración de HA o mediante ensayo en placa, tal como se describió previamente (Rossignol *et al.* 2009). Para el ensayo en placa, se prepararon diluciones en serie de 10 veces del virus y se inocularon en monocapas de células AGMK confluentes en placas de 35 mm (Corning, Nueva York, NY). Después de 1 h a 37°C, se retiró el inóculo y las células se lavaron tres veces con PBS antes de la adición de RPMI que contenía BSA al 0,5%, tripsina 1 µg/ml tratada con TPCK y agarosa SeaPlaque al 0,5% (Lonza). Después de 72 h a 37°C, se retiró la superposición y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y se tiñeron con cristal violeta al 1% (Sigma-Aldrich). La CI₅₀ (concentración inhibitoria al 50%) e CI₉₀ (concentración inhibitoria al 90%) de los compuestos antivirales se calculó usando el software Prism 5.0.

El pneumovirus humano VRS-A2 (virus respiratorio sincicial, cepa A2) fue proporcionado por el Dr. G. Toms, Universidad de Newcastle, Newcastle upon Tyne, R.U. Para la infección por VRS, se infectaron monocapas de células HeLa confluentes durante 1 h a 37°C con VRS-A2 a una MOI de 1 TCID₅₀ (dosis infecciosa de cultivo tisular al 50%)/célula. La producción de VRS-A2 se evaluó contando el número de sincitios inducidos por virus a las 48 horas p.i., tal como se determina mediante análisis de inmunofluorescencia (IF) después de marcar con un anticuerpo monoclonal específico para la proteína de fusión (proteína F) de VRS (anticuerpo anti-F 1E3, Viratom Ltd., Newcastle upon Tyne, R.U.). Para el análisis de IF, las monocapas de células HeLa no infectadas e infectadas con VRS se fijaron

65

con paraformaldehído al 4% (4% en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células fijadas se incubaron con el anticuerpo anti-F 1E3 durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido se retiró mediante enjuague en PBS, seguido de incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la tinción, las células se examinaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM-11 equipado con filtros de excitación UV. Las imágenes se capturaron con una cámara Leica DC-300 usando el software Leica Image-Manager500. Se contaron al menos 150 sincitios para cada muestra. Se descubrió que la nitazoxanida posee actividad antiviral contra el VRS-A2 a dosis no citotóxicas, con una CI_{50} de 0,3 $\mu\text{g/ml}$ y una CI_{90} de 0,8 $\mu\text{g/ml}$.

Marcaje metabólico, análisis de síntesis de proteínas e inmunotransferencia de tipo Western. Las células infectadas de forma simulada o infectadas con virus se marcaron con 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^{35}S]-metionina-cisteína ([^{35}S]-Met/Cys, mezcla de marcaje celular *in vitro* Redivue Pro-Mix ^{35}S ; GE Healthcare) durante los tiempos indicados después de 30 minutos de inanición en medio libre de metionina/cisteína. Se determinó la incorporación de [^{35}S]-Met/Cys después de la lisis celular en tampón RIPA (ensayo de precipitación radioinmunitaria) (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 4 mM, Triton X-100 al 1%, KCl 600 mM), que contiene fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF) y una mezcla de inhibidores de proteasas (PIC; Roche Applied Science, Penzberg, Alemania). Las muestras que contenían la misma cantidad de radiactividad o la misma cantidad de proteína se separaron por SDS/PAGE (gel de apilamiento al 3%, gel de resolución al 10%) y se procesaron para autorradiografía, tal como se describe (Pica *et al.*, 2000). Los patrones autorradiográficos se visualizaron y cuantificaron en un aparato Typhoon-8600 Imager [(Molecular Dynamics Phosphor-Imager™ (MDP)], y las imágenes se adquirieron usando el software ImageQuant (Amersham Pharmacia Biotech) (análisis MDP).

Para el análisis de proteínas solubles/insolubles, se prepararon extractos de células completas (WCE) después de lisis en tampón de extracción con alto contenido de sal (tampón B) (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, NP-40 al 0,5% y glicerol al 10%) complementado con ditioneitol 2 mM (DTT), β -glicerolfosfato 20 mM, (fosfato de p-nitrofenilo) PNPP 19 mM, Na_3VO_4 2 mM, PMSF 1 mM y cóctel de inhibidores de proteasa (Roche) (Rossi *et al.*, 2000). Brevemente, las células se lavaron dos veces con PBS helado y luego se lisaron en tampón B (80 μl). Después de un ciclo de congelación y descongelación, y centrifugación a 15.000 rpm (15 min a 4°C), se recogieron las fracciones de sobrenadante (soluble) y sedimento (insoluble). Las fracciones insolubles se solubilizaron en 60 μl de tampón S (Tris-HCl 50 mM pH 8,5, SDS al 1% e inhibidores de la proteasa) mediante sonicación en hielo, usando un procesador ultrasónico UP50H (Hielscher) (40% de amplitud, modo de pulso: 6 x 10 segundos, pausas de 15 segundos). Los extractos totales se obtuvieron lisando células en tampón de Laemmli seguido de cizalladura de ADN a través de una jeringa de insulina de calibre 28 $\frac{1}{2}$ 10 veces.

Para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western, los extractos celulares (25 μg) se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa, y los filtros se incubaron con los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales anti-SeV-F (aF- γ 236; ID Pharma) y anti- α -tubulina (B-5-1-2, Sigma-Aldrich); anticuerpos policlonales anti- α -tubulina (11H10; Cell Signaling Technology Inc.), anti-FLAG (etiqueta DYKDDDDK, Cell Signaling Technology, Inc.) y anti- β -actina (Sigma-Aldrich), seguido de decoración con anticuerpo anti-IgG de conejo, anti-IgG de cabra o anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (kit de detección SuperSignal; Pierce).

Microscopía de inmunofluorescencia. Las células AGMK o A549 infectadas con SeV y las células HeLa transfectadas con VRS-F o HeV-F hechas crecer en cubreobjetos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente a 24 h p.i. Las células infectadas de forma simulada o transfectadas de forma simulada se procesaron de manera similar. Las células fijadas se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-F (aF- γ 236; ID Pharma) o anticuerpos policlonales anti-FLAG (etiqueta DYKDDDDK, Cell Signaling Technology, Inc.) durante 1 h a 37°C para la tinción de la membrana plasmática, o se permeabilizaron con PBS-TritonX-100 al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-F y anti-calnexina (Stressgene) o anticuerpos policlonales anti- α -tubulina (11H10; Cell Signaling Technology Inc.) durante 1 h a 37°C, seguido de una decoración con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor488 (Molecular Probes-Invitrogen) o conjugado con rodamina (Pierce) y anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con rodamina (Pierce). Los núcleos se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) o Hoechst 33342 (Molecular Probes, Invitrogen). Las imágenes se capturaron con un sistema de barrido de láser confocal Olympus Fluoview FV-1000, usando el software FluoView-1000.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó con el método de la prueba de la *t* de Student para datos no emparejados. Los datos se expresan como las medias \pm DE de muestras duplicadas. Los valores de *p* de <0,05 se consideraron significativos.

Bibliografía

Bernasconi, D., Amici, C., La Frazia, S., Ianaro, A. y Santoro, M. G. (2005) *J. Biol. Chem* 280, 24127-24134.

La Frazia, S., Amici, C. y Santoro, M. G. (2006) *Antivir. Ther.* 11, 995-1004.

Pica, F., Palamara, A. T., Rossi, A., De Marco, A., Amici, C. y Santoro, M. G. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.*

44, 200-204.

Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M. y Santoro, M. G. (2000) Nature 403, 103-108.

5 Rossignol, J. F., La Frazia, S., Chiappa, L., Ciucci, A., Santoro, M.G. (2009) J. Biol. Chem. 284, 29798-29808.

Estudio RM08-3002 (datos de ensayos clínicos para enterovirus/rinovirus)

10 Un ensayo aleatorizado realizado en los Estados Unidos, Canadá, Bélgica, Australia y Nueva Zelanda estudió el efecto de NTZ, oseltamivir (OST), NTZ+OST y placebo sobre el tiempo hasta el alivio de los síntomas en sujetos de 13 a 65 años de edad con gripe sin complicaciones o enfermedad similar a la gripe. Se inscribieron 1.941 sujetos con fiebre, al menos un síntoma respiratorio moderado o intenso (tos, dolor de garganta, obstrucción nasal) y al menos un síntoma constitucional moderado o intenso (fiebre, cefalea, mialgia, fatiga, tos, obstrucción nasal y dolor de garganta) en el plazo de 48 horas de la aparición de los síntomas. Se recogieron frotis nasofaríngeos al nivel inicial del estudio y se sometieron a cultivo viral y RT-PCR para identificar las causas virales de la enfermedad.

15 Después de la inscripción, los pacientes se asignaron aleatoriamente para recibir tratamiento con comprimidos de liberación prolongada de nitazoxanida (NTZ), cápsulas de oseltamivir (OST), NTZ+OST o placebo. Cada tratamiento se administró dos veces al día durante 5 días. La dosis de NTZ fue de 600 mg, y la dosis de OST fue de 75 mg.

20 Los pacientes registraron la intensidad de sus síntomas dos veces al día durante al menos 14 días como o bien ausentes, leves, moderados o bien intensos, y los síntomas se consideraron aliviados cuando todos los síntomas se calificaron como ausentes o leves y permanecieron así durante al menos 24 horas sin el uso de medicamentos para el alivio de los síntomas. El criterio de valoración primario del estudio fue el tiempo desde la primera dosis hasta el alivio de los síntomas.

25 Basándose en ensayos de RT-PCR (panel de patógenos respiratorios NxTAG de Luminex) de muestras de frotis nasofaríngeo, 251 sujetos tenían virus del género *Enterovirus* (incluyendo enterovirus y rinovirus) identificados como su única causa de enfermedad. Los tiempos hasta el alivio de los síntomas para estos pacientes se representan en un gráfico de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier presentado en la figura 2.

30 Ambos grupos de tratamiento que recibieron NTZ mostraron reducciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el tiempo hasta el alivio de los síntomas en comparación con los pacientes que recibieron placebo. La mediana de reducción del tiempo hasta el alivio de los síntomas en comparación con el placebo fue de aproximadamente 47 horas.

35 Cuando los dos grupos que recibieron NTZ se combinaron y se compararon con los dos grupos que no recibieron NTZ (OST y placebo), los pacientes que recibieron NTZ mostraron reducciones significativas ($p=0,005$) en los tiempos hasta el alivio de los síntomas para pacientes que recibieron NTZ en comparación con los que no. Los resultados de esta comparación se presentan en la figura 3.

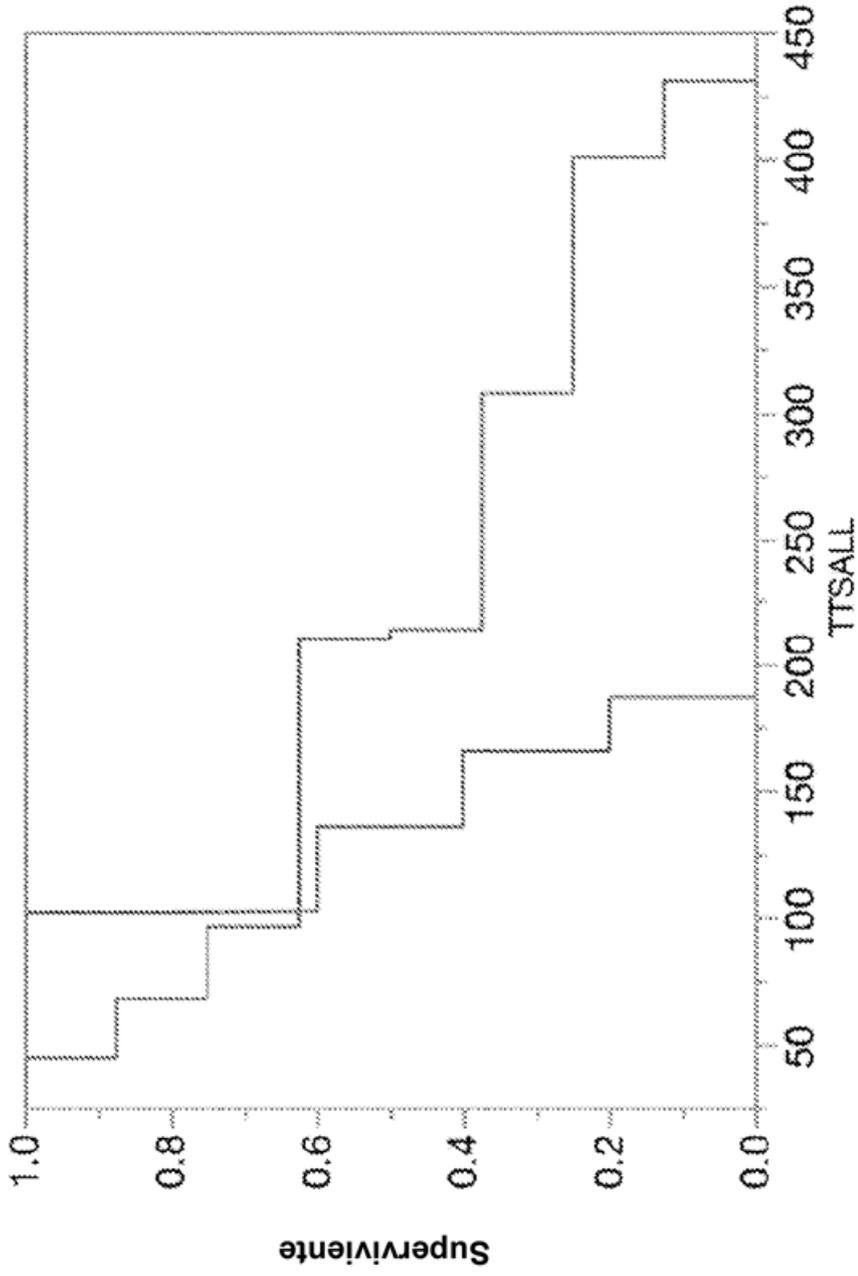
40 Basándose en ensayos de RT-PCR (panel de patógenos respiratorios NxTAG de Luminex) de muestras de frotis nasofaríngeo, 13 pacientes tenían el virus respiratorio sincicial identificado como su única causa de enfermedad. Los tiempos hasta el alivio de los síntomas, tales como febrilidad, cefalea, mialgia, fatiga, tos, obstrucción nasal y dolor de garganta, para estos pacientes se representan en un gráfico de análisis de supervivencia de Kaplan-Meier presentado en la figura 1.

45

REIVINDICACIONES

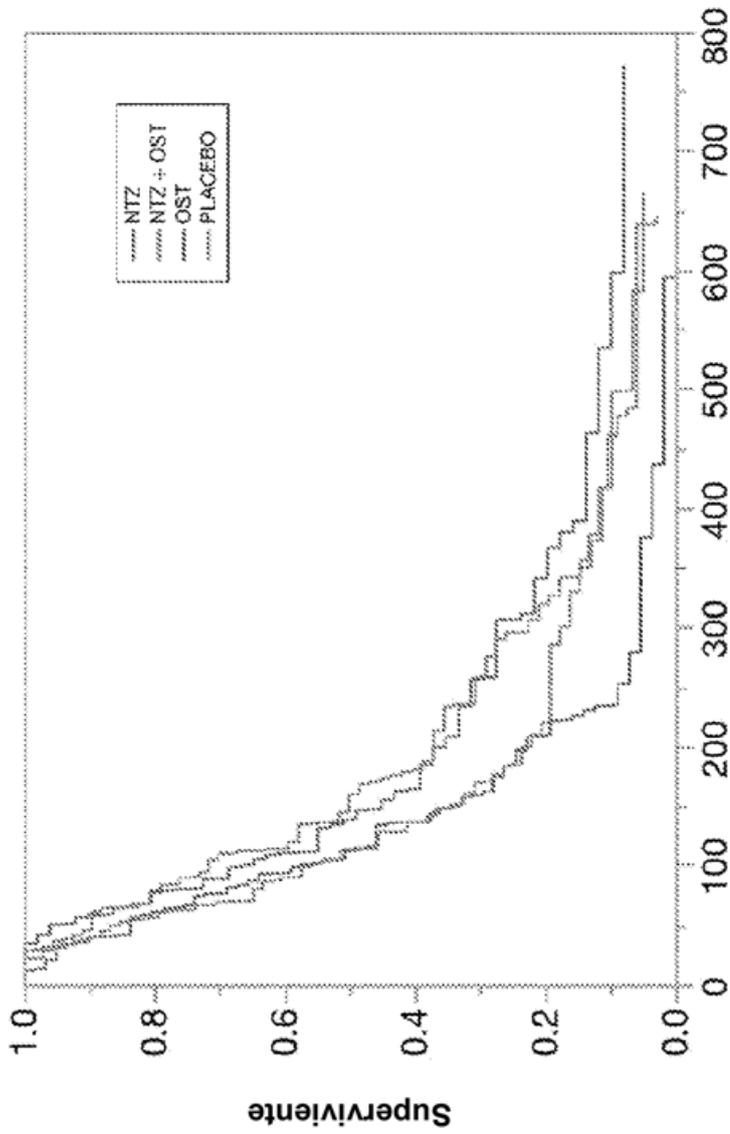
- 5 1. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de nitazoxanida o tizoxanida o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o estado provocado por o asociado con un virus que pertenece a la familia *Picornaviridae*, en la que dicho método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha composición farmacéutica.
- 10 2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el virus pertenece al género *Enterovirus*.
- 15 3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha administración alivia al menos un síntoma de la enfermedad o estado, en la que el al menos un síntoma se selecciona de fiebre, tos, dolor de garganta, obstrucción nasal, fatiga, cefalea, mialgia y febrilidad.
- 20 4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en la que dicha administración a) reduce la fiebre provocada por o asociada con la enfermedad o estado y b) alivia al menos un síntoma de la enfermedad o estado, en la que el al menos un síntoma se selecciona de tos, dolor de garganta, obstrucción nasal, fatiga, cefalea, mialgia y febrilidad.
- 25 5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en la que la administración a) reduce la fiebre provocada por o asociada con la enfermedad o estado, y b) alivia al menos un síntoma respiratorio provocado por o asociado con la enfermedad o estado y al menos un síntoma constitucional asociado con la enfermedad o estado, en la que el al menos un síntoma respiratorio se selecciona de tos, dolor de garganta y obstrucción nasal y en la que el al menos un síntoma constitucional se selecciona de fatiga, cefalea, mialgia y febrilidad.
- 30 6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que el virus se selecciona de *Enterovirus A-J*.
- 35 7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que el virus se selecciona de *Rhinovirus A-C*.
8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, que comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antiviral de acción directa.
- 40 9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en la que el agente antiviral de acción directa es rupintrivir o MK-0608 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 45 10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha administración comienza en el plazo de 48 horas de una aparición en el sujeto de al menos un síntoma de la enfermedad o estado, en la que el al menos un síntoma se selecciona de fiebre, tos, dolor de garganta, obstrucción nasal, fatiga, cefalea, mialgia y febrilidad.
11. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto es un humano.

FIG. 1



	NITZ	Placebo
N (N censurados)	5 (0)	8 (0)
Mediana de las horas (IQR)	137.1 (104-167)	212.8 (83-355)
Valor de <i>p</i> , rangos logarítmicos		0.1417

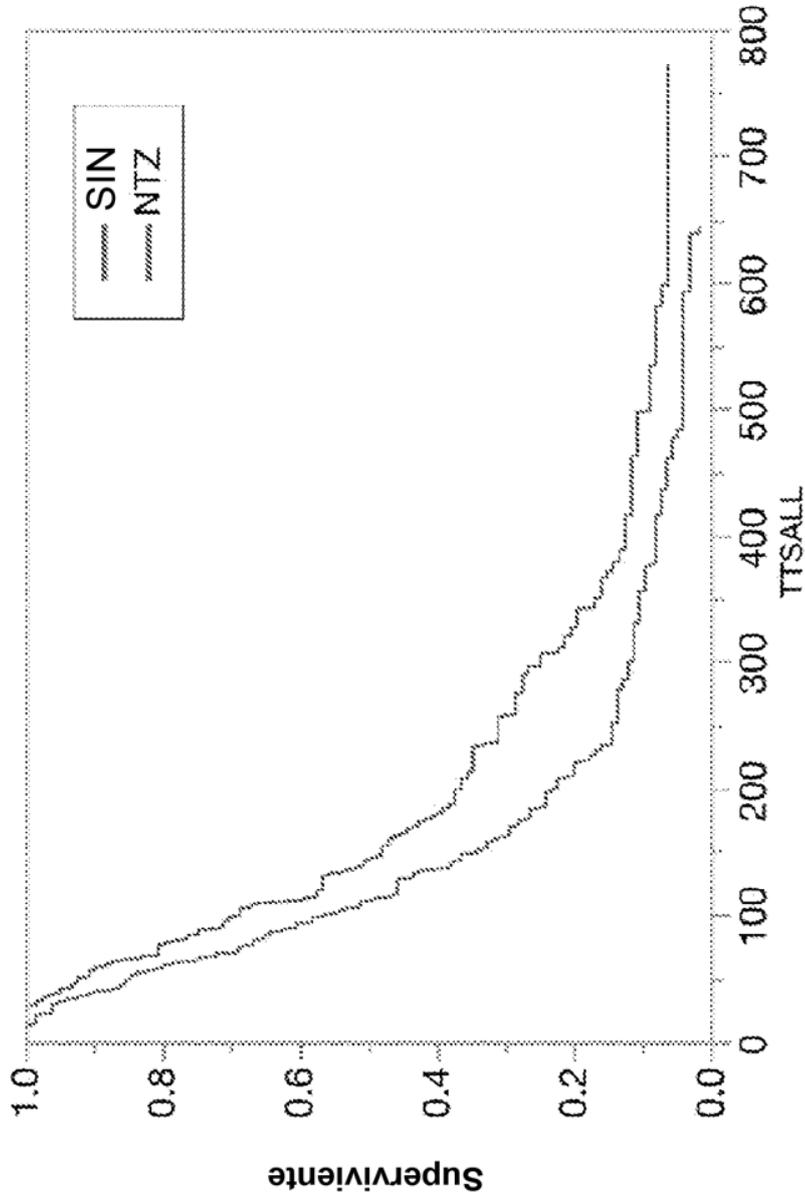
FIG. 2



Tiempo hasta el alivio de los síntomas (horas)

	NITZ	NITZ+OST	OST	Placebo
N (censurados)	61 (1)	70 (5)	52 (5)	68 (7)
Mediana (IQR)	115.6 (69-187)	114.1 (65-187)	141.3 (83-310)	162.5 (92-298)
Valor de p frente a placebo				
Prueba de Prentice-Wilcoxon	0.0172	0.047	0.4169	-

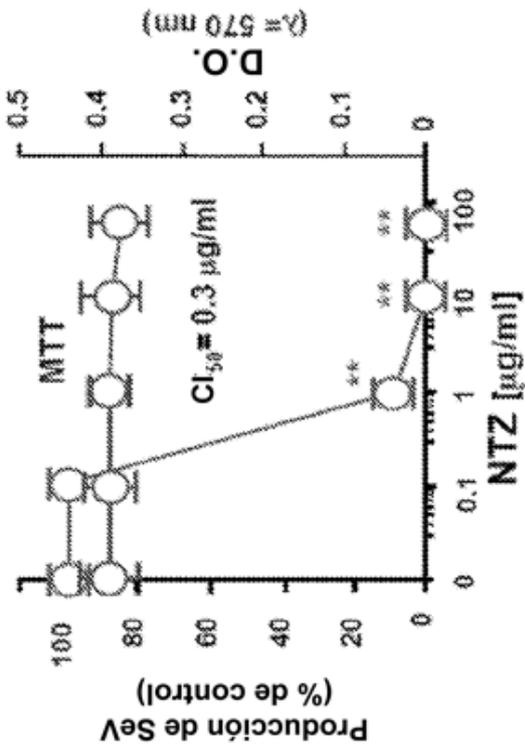
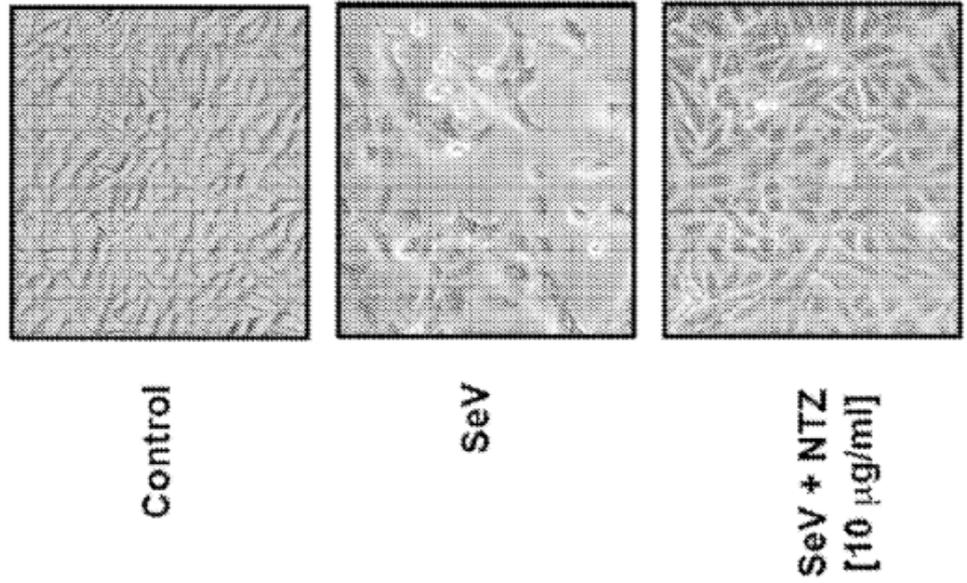
FIG. 3



	Grupos con NTZ	Grupos sin NTZ
N (censurados)	131 (6)	120 (12)
Mediana (IQR)	114.5 (67-187)	146.5 (87-299)
Prueba de Prentice-Wilcoxon	0.0050	

Figuras 4 A-B

Actividad antiviral de nitazoxanida en células AGMK infectadas con SeV



m.o.i.: 3 UFP/célula
(24 h p.i.)

Figura 5

La actividad antiviral de nitazoxanida en células infectadas con SeV es independiente de la multiplicidad de infección

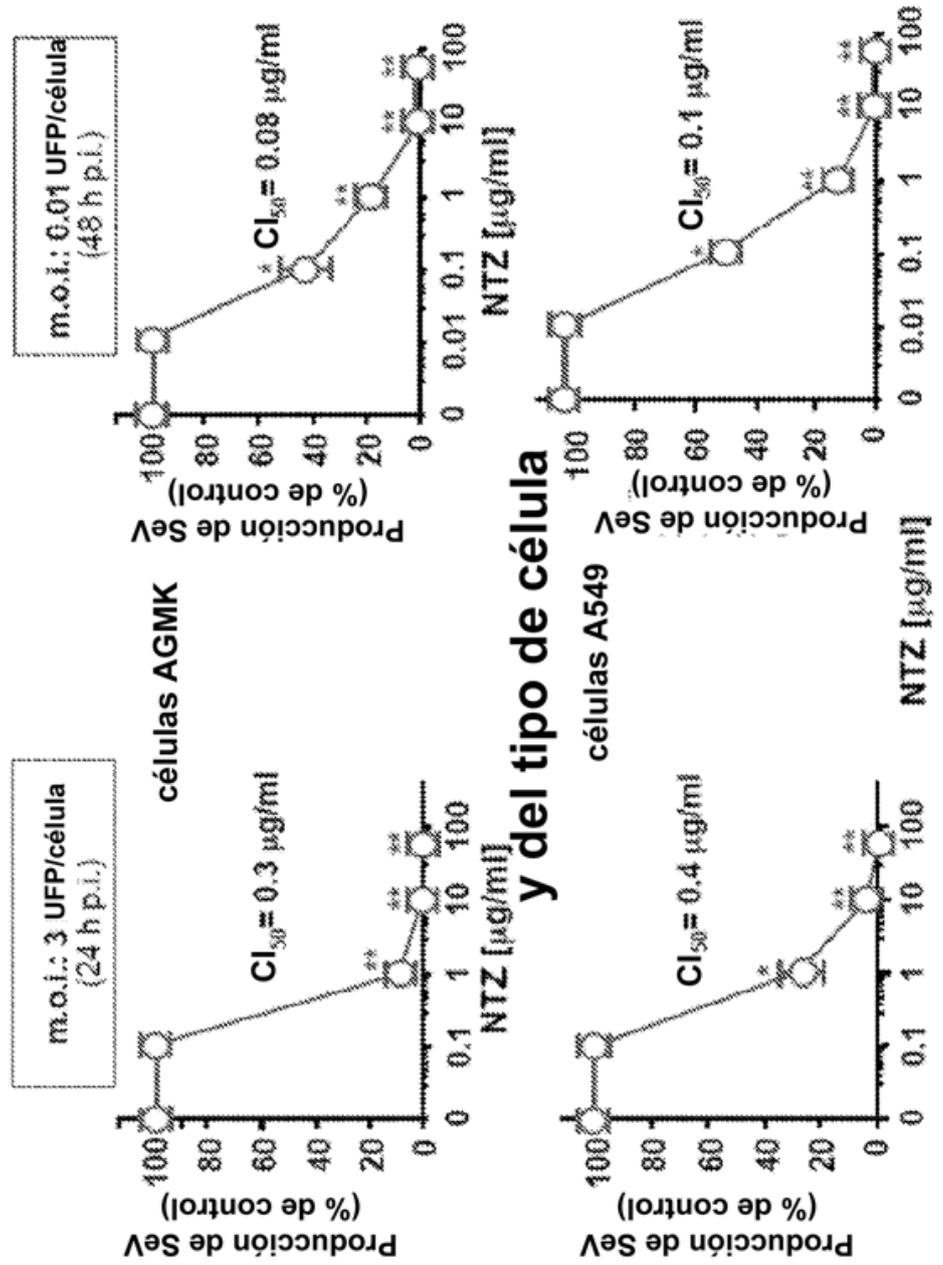
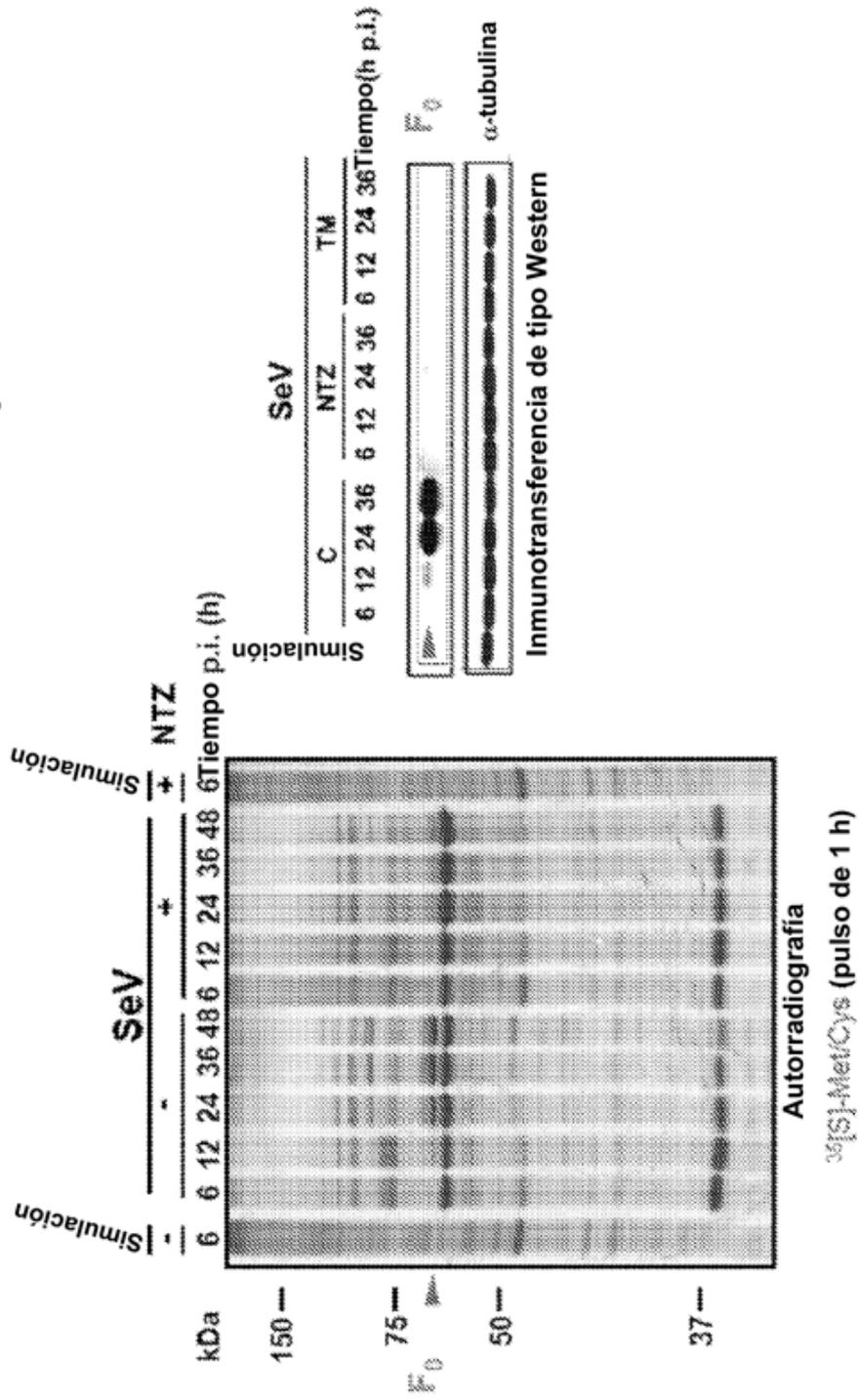


Figura 7

Efecto de nitazoxanida sobre la síntesis de proteína SeV-F



SeV = m.o.i. 3 UFP/célula

NTZ = 10 µg/ml

TM = Tunicamicina 2.5 µg/ml

AcM αSeV-F

Células AGMK

24 h p.i.

Figura 8

Detección de la forma inmadura de la proteína SeV-F en la fracción insoluble de extractos de proteína AGMK tratados con NTZ

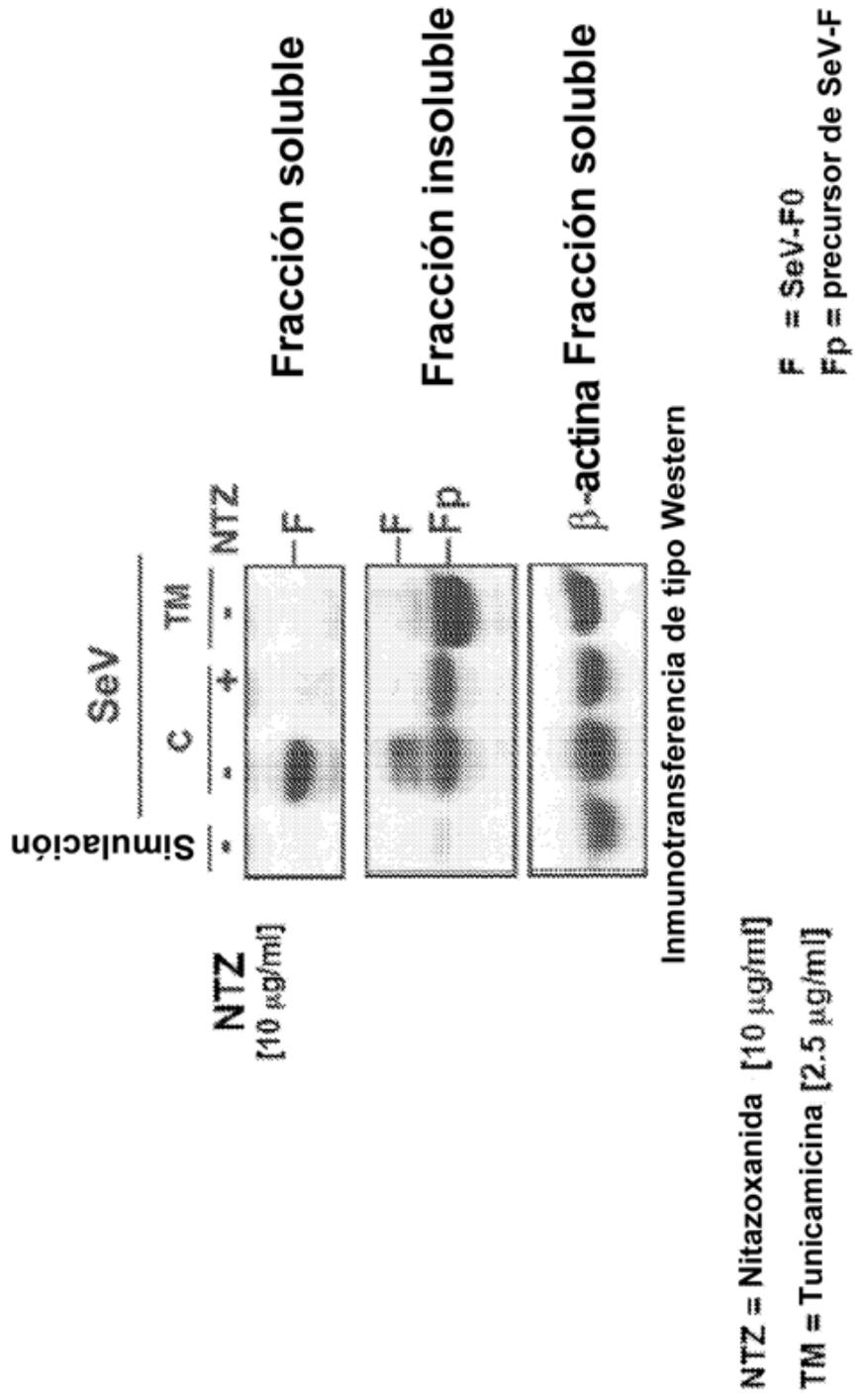
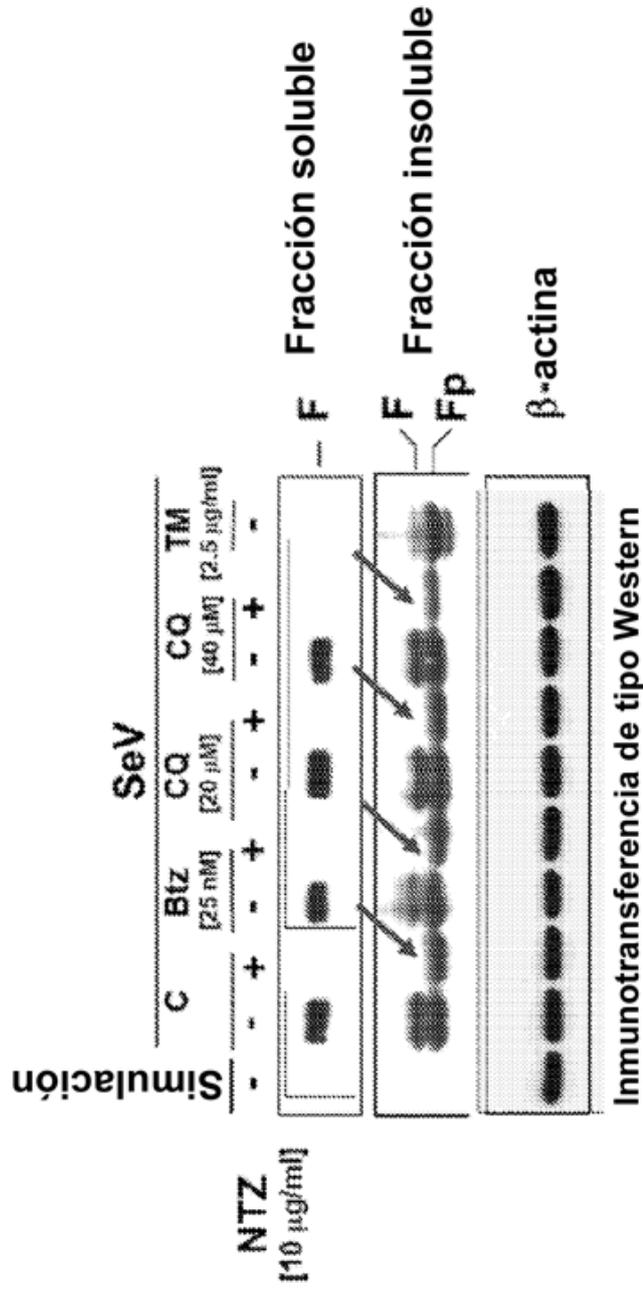


Figura 9

Detección de la forma inmadura de la proteína SeV-F en la fracción insoluble de extractos de proteína de células AGMK tratadas con NTZ



NTZ = Nitazoxanida [10 µg/ml]

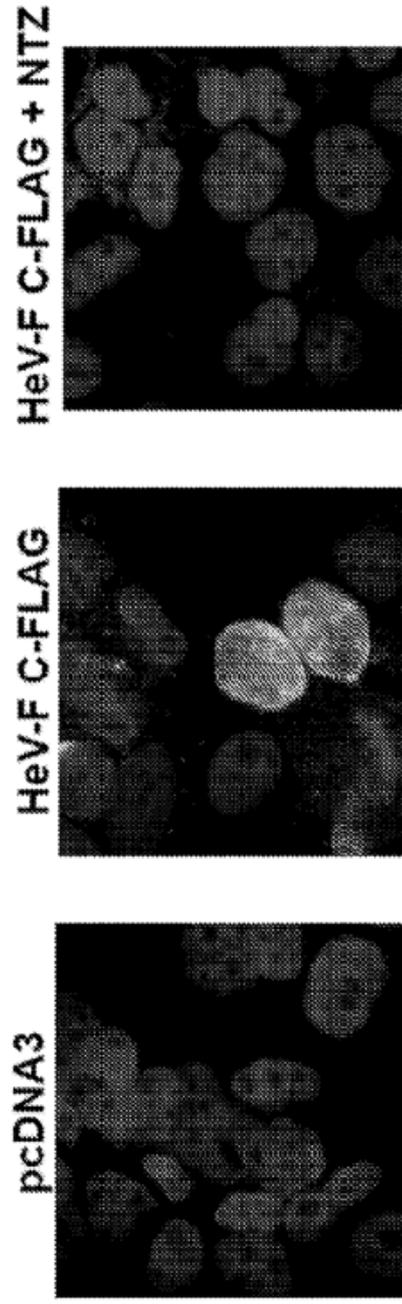
TM =Tunicamicina [2.5 µg/ml]

F = SeV-F0

Fp = precursor de SeV-F

Figura 10

La nitazoxanida inhibe el transporte de la glicoproteína HeV-F a la superficie celular



NTZ [10 ng/ml]

Células HeLa

Figuras 11 A-C

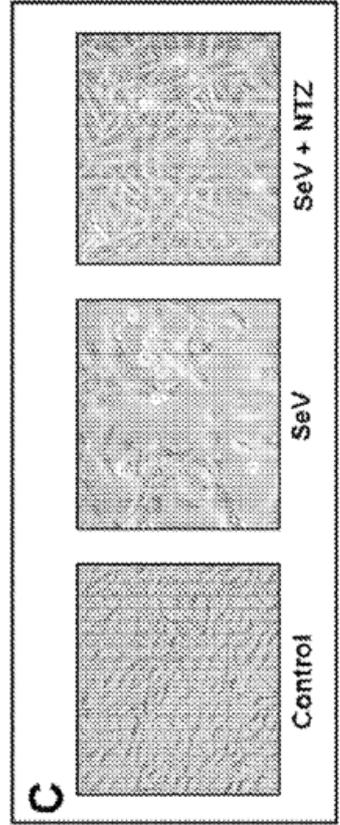
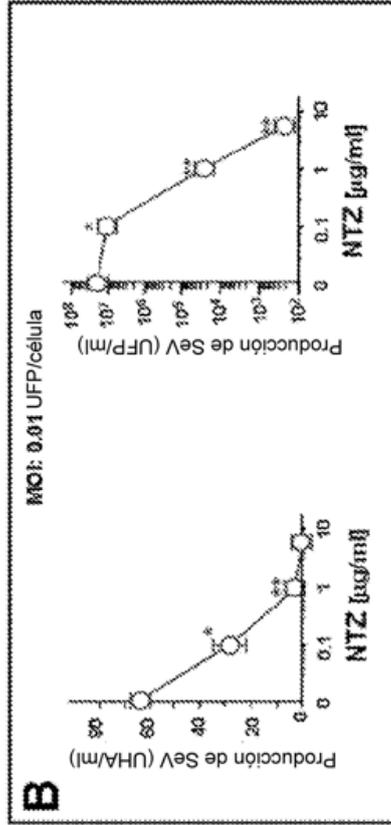
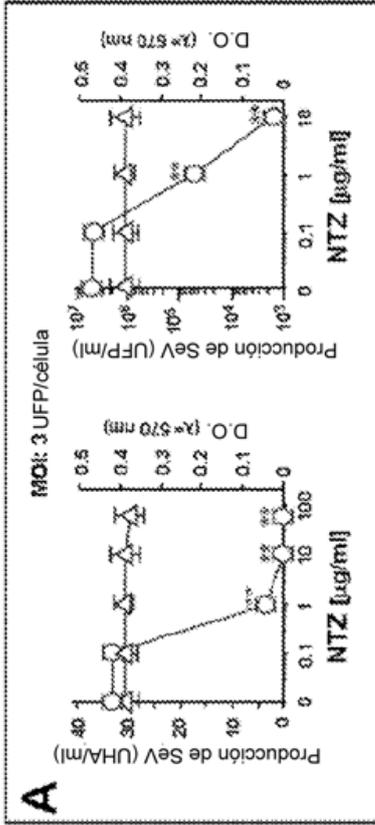
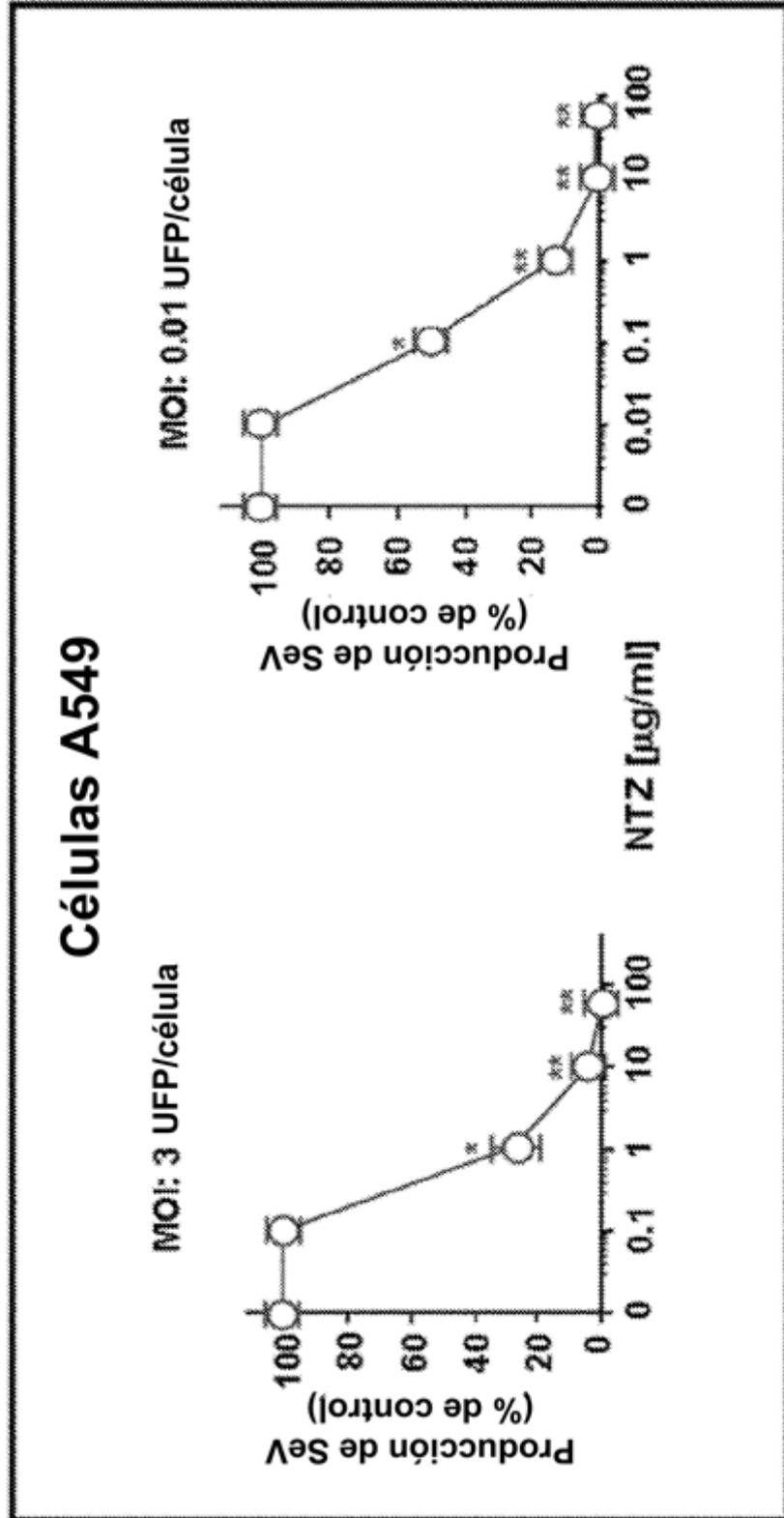
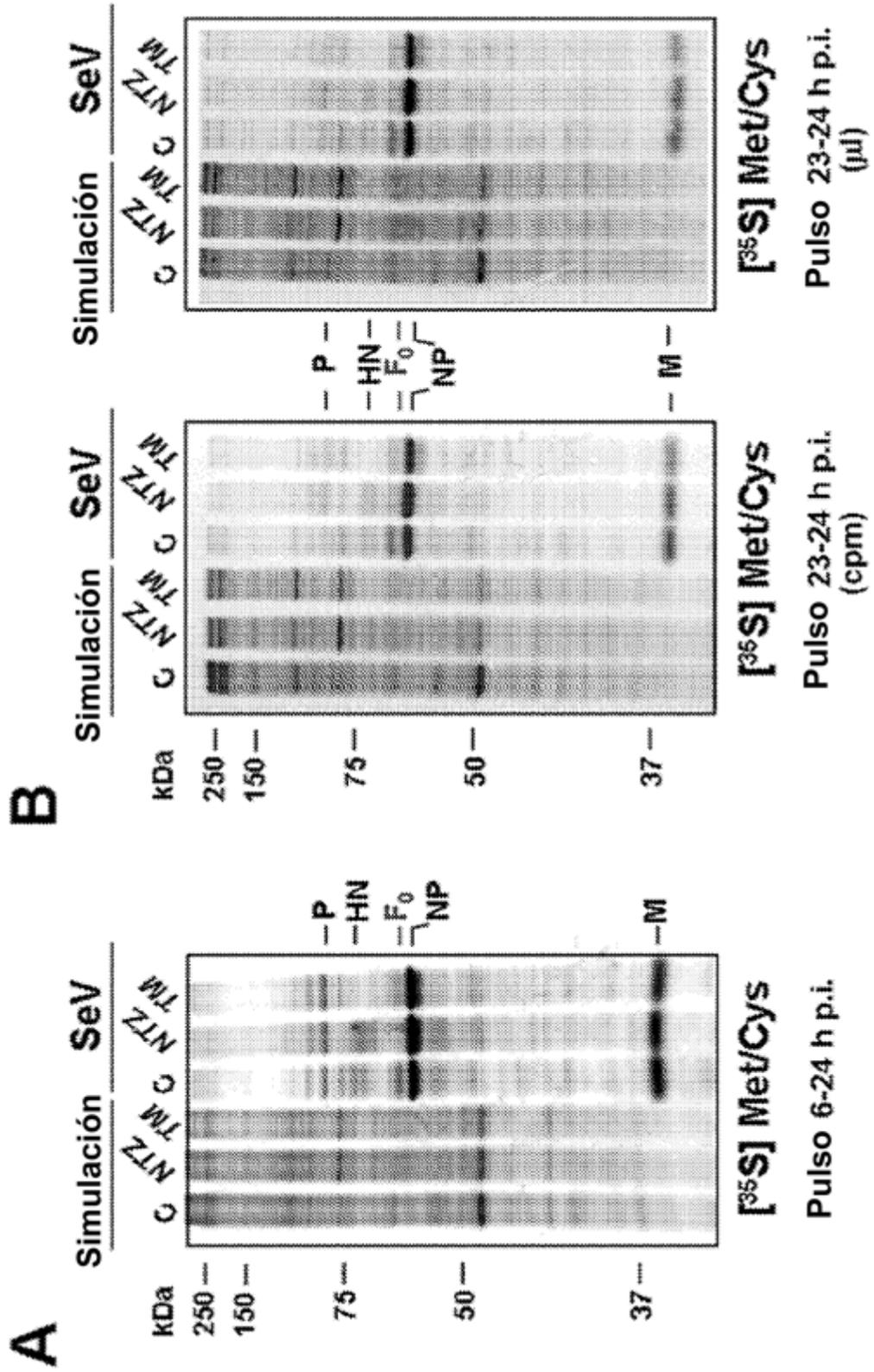


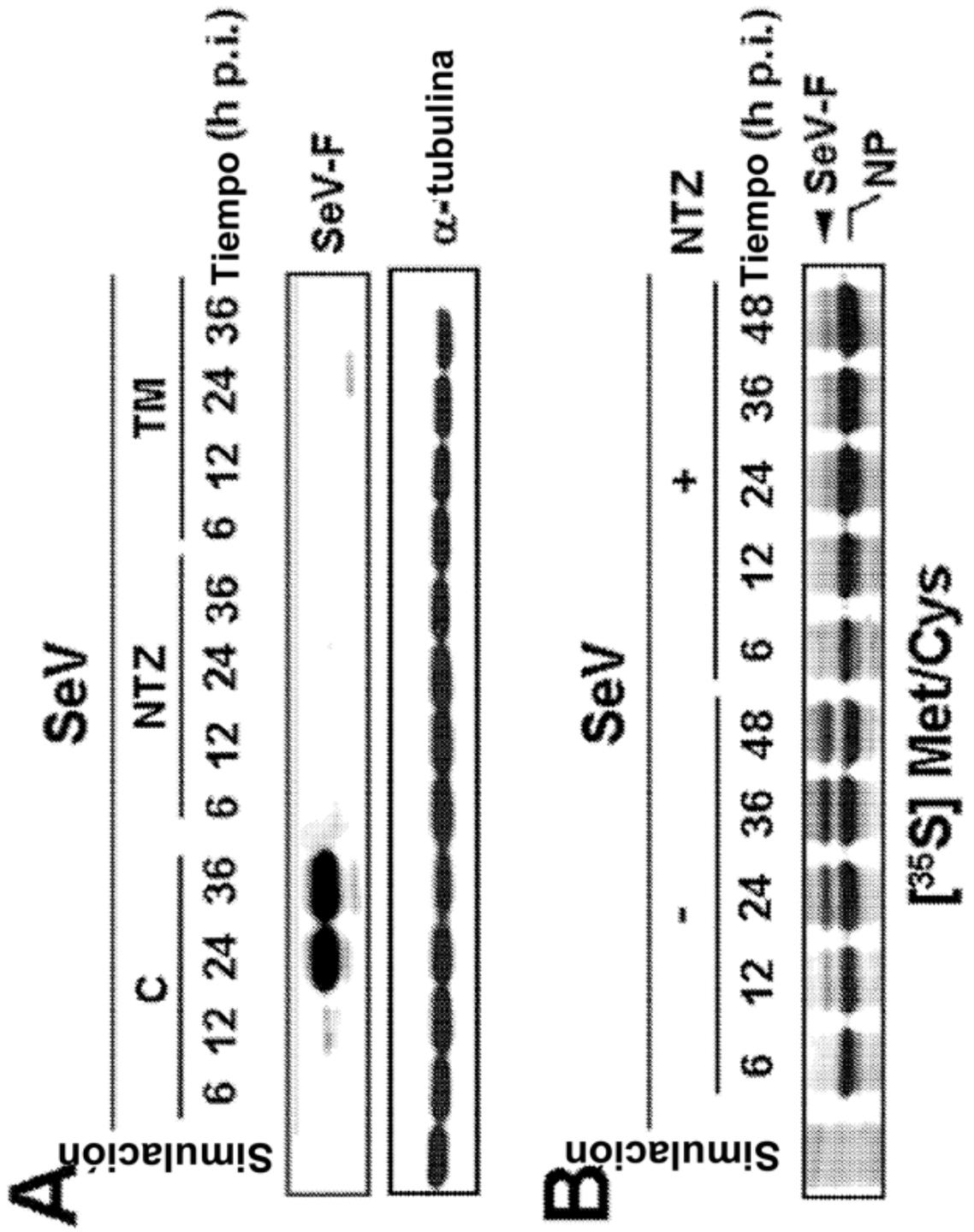
Figura 12



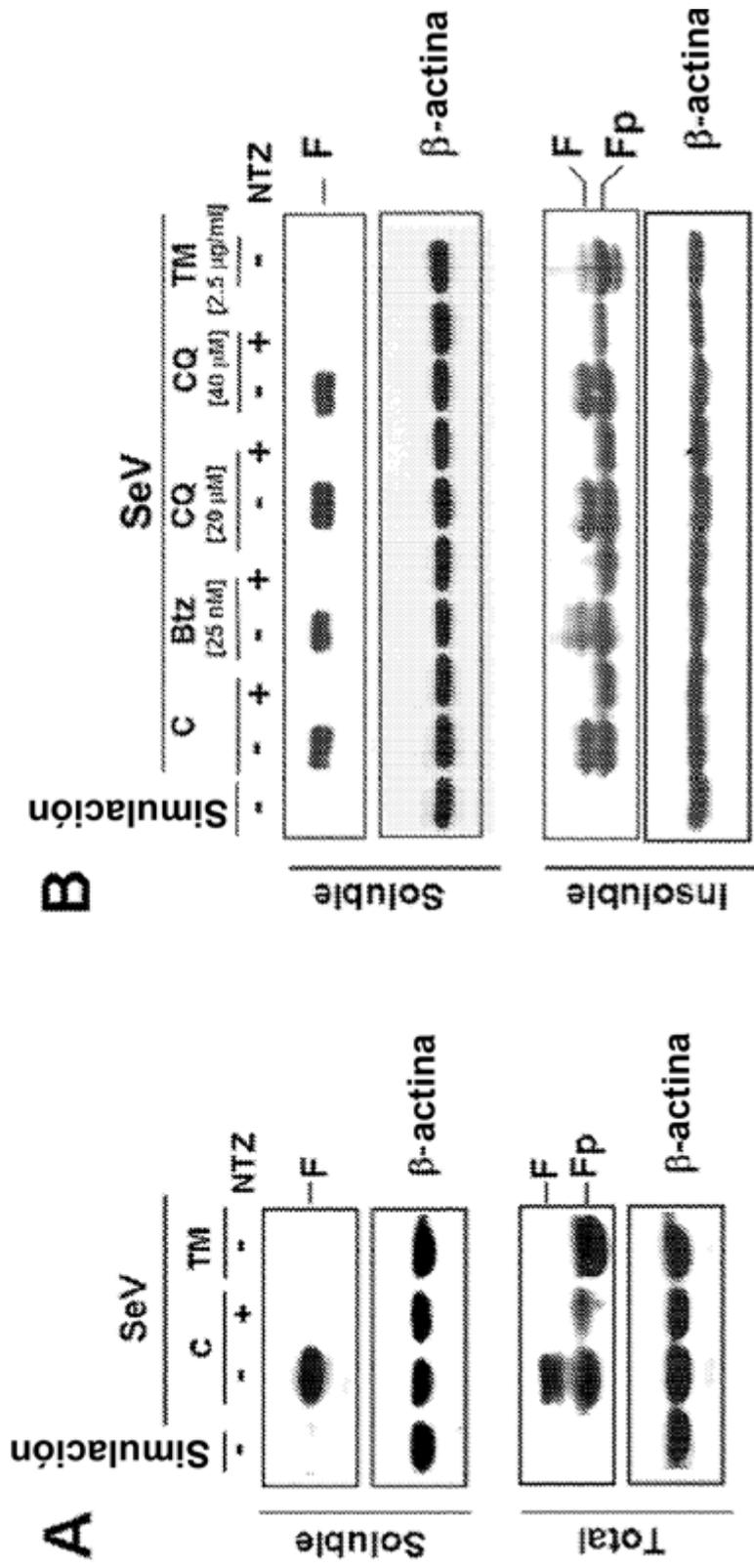
Figuras 13 A-B



Figuras 14 A-B



Figuras 15 A-B



Figuras 16

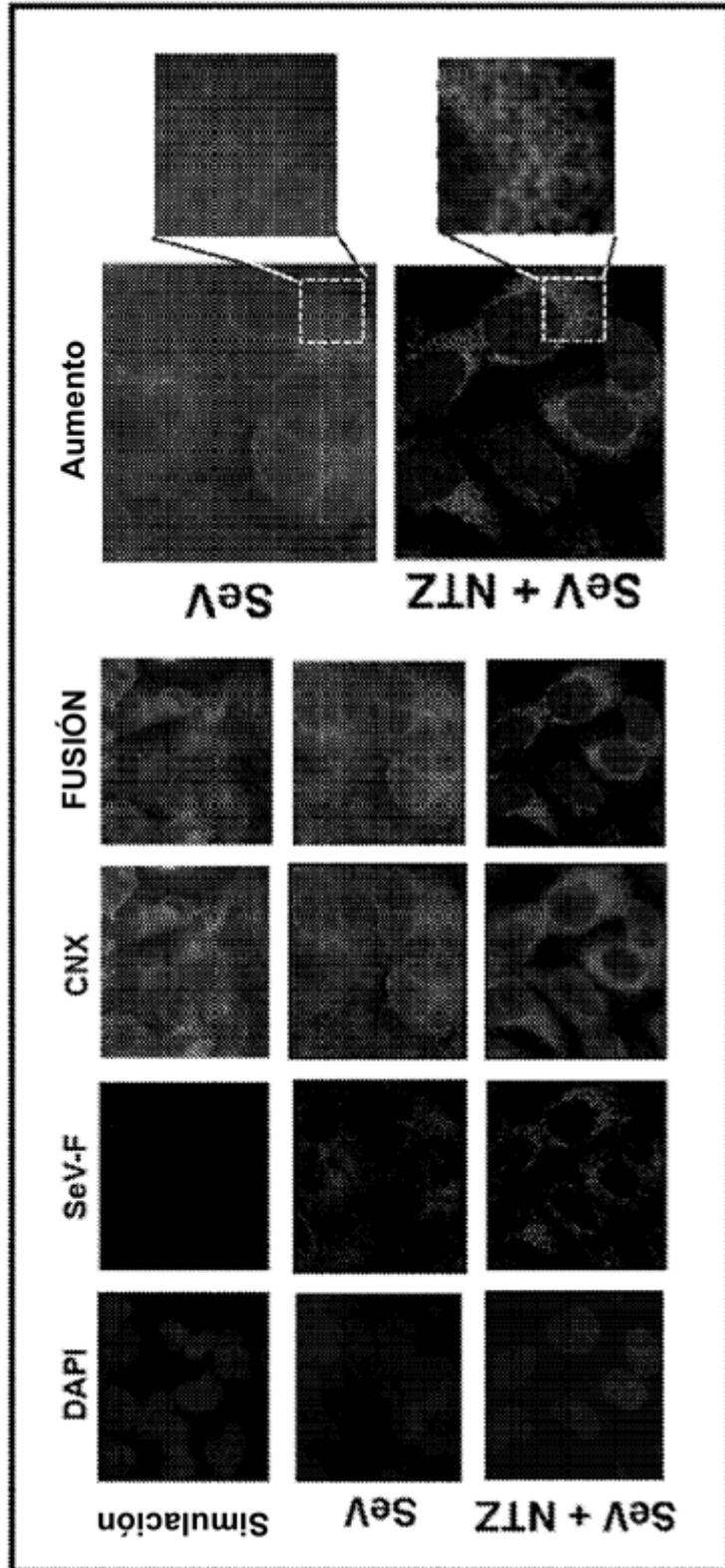
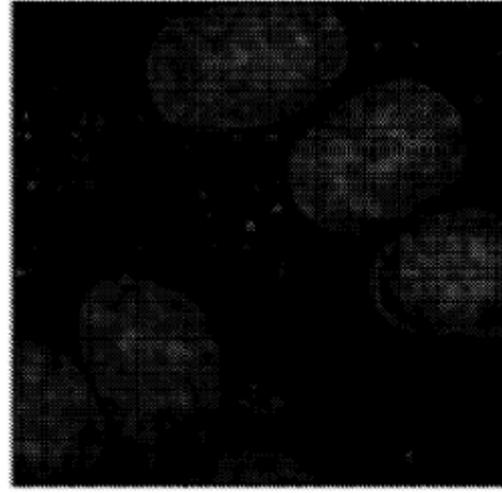
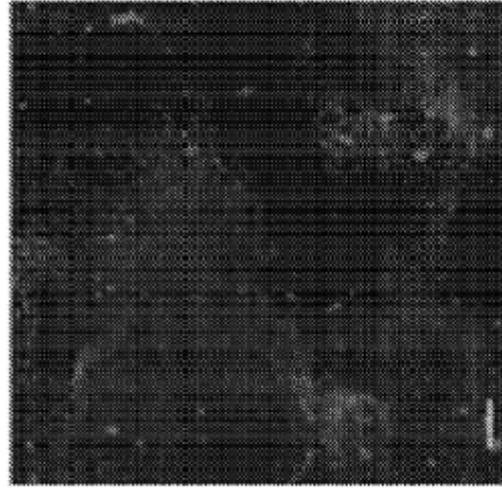


Figura 17

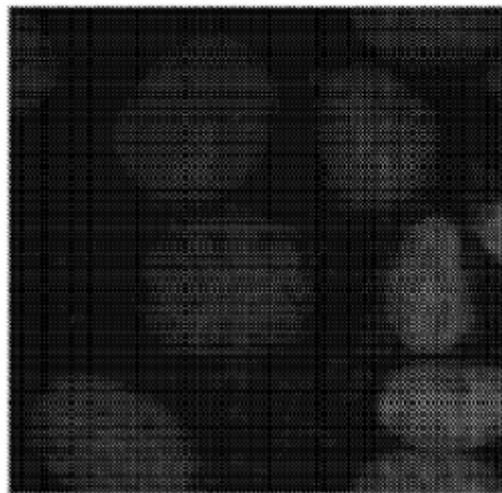
Marcaje superficial de SeV-F



SeV + NTZ

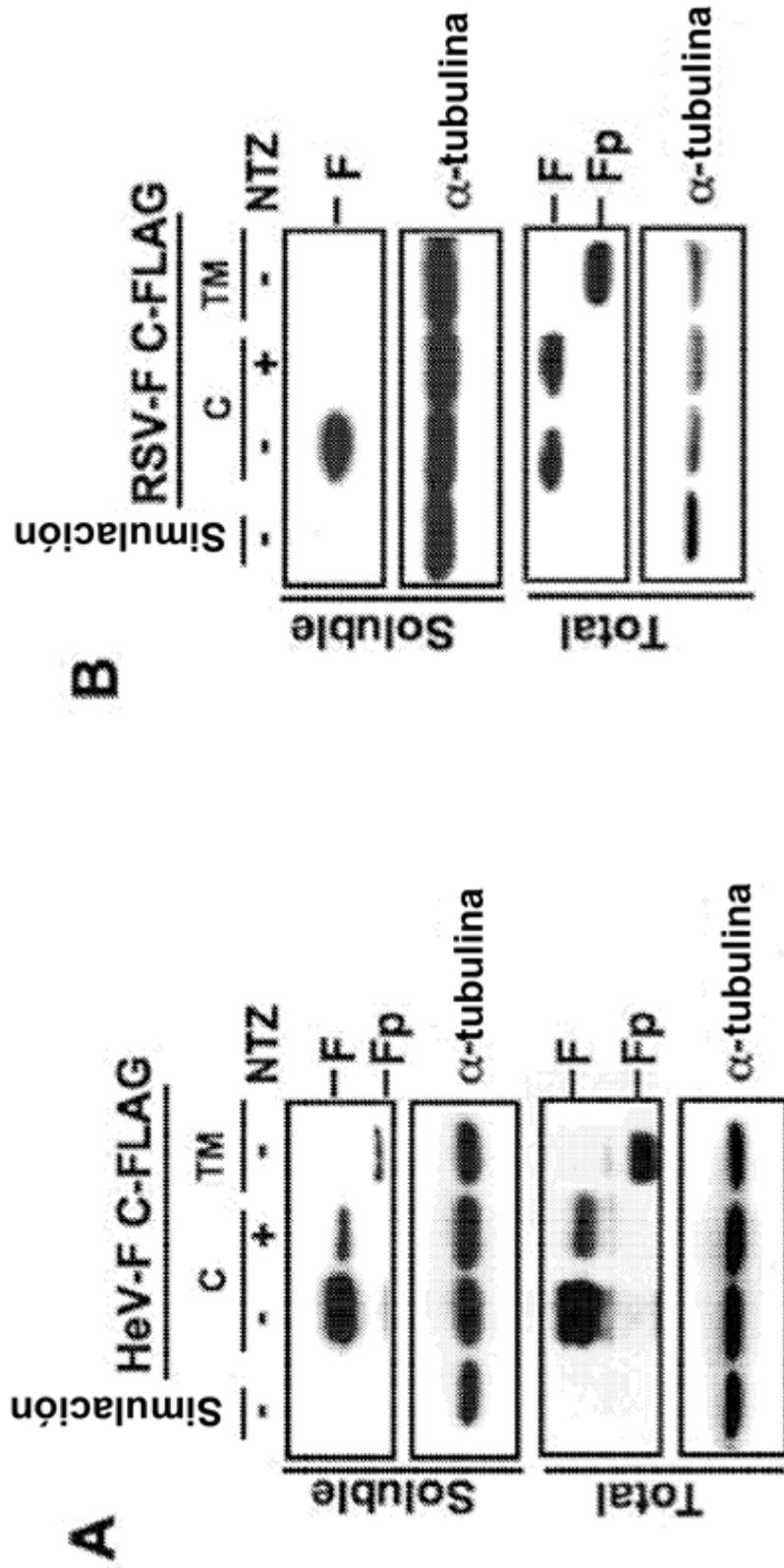


SeV



Simulación

Figuras 18 A-B



Figuras 19 A-B

