

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 304**

51 Int. Cl.:

A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2012 PCT/US2012/037958**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12158699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2012 E 12786263 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2709453**

54 Título: **Utilización de compuestos de tiazolida para la prevención y el tratamiento de enfermedades víricas, cáncer y enfermedades causadas por infecciones intracelulares**

30 Prioridad:

16.05.2011 US 201161486728 P

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

17.06.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ROSSIGNOL, JEAN-FRANCOIS

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 767 304 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

Utilización de compuestos de tiazolida para la prevención y el tratamiento de enfermedades víricas, cáncer y enfermedades causadas por infecciones intracelulares.

Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional US 61/486.728, presentada el 16/5/2011, incorporada en la presente memoria como referencia en su totalidad.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para inmunomodulación, que incluye prevenir o tratar enfermedades víricas de la gripe.

Antecedentes de la invención

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa que afecta a todos los grupos de edad y provoca alrededor de 36,000 muertes y alrededor de 226,000 hospitalizaciones por año únicamente en los Estados Unidos de América.

Clasificada (como tipos A, B, y C) según diferencias antigénicas en su nucleoproteína y en la proteína de la matriz, los virus de la gripe son virus de ARN de cadena negativa con cubierta. Los muchos subtipos de virus de la gripe A difieren en sus dos glicoproteínas de superficie, hemaglutinina ("HA") y neuraminidasa ("NA"), que son las dianas principales de la respuesta inmunitaria protectora, y se marcan según el tipo de hemaglutinina (representada con el número H) y neuraminidasa (representada con el número N). HA y NA varían continuamente como resultado de la deriva antigénica y el reordenamiento antigénico. Se conocen dieciséis subtipos H (o "serotipos") y nueve subtipos N.

La hepatitis B es una enfermedad infecciosa causada por el virus de la hepatitis B (HBV). Alrededor de un cuarto de la población mundial, más de 2 mil millones de personas, han sido infectadas con el virus de la hepatitis B. La enfermedad aguda provoca inflamación hepática, vómitos, ictericia y, raramente, la muerte. La hepatitis B crónica puede provocar eventualmente cirrosis hepática y cáncer hepático – una enfermedad mortal con una respuesta muy pobre a quimioterapia actual. El virus de la hepatitis B presenta un genoma circular compuesto de ADN parcialmente bicatenario y, similarmente a los retrovirus, se replica a través de un intermedio de ARN mediante transcripción inversa. Aunque la replicación tiene lugar en el hígado, el virus se disemina hasta la sangre, en la que las proteínas específicas del virus y sus anticuerpos correspondientes son encontrados en las personas infectadas.

El cáncer se caracteriza por el crecimiento incontrolado y diseminación de células anormales. Debido a que las células tumorales proceden de células normales, el sistema inmunitario del hospedante no reconoce a los antígenos de las células tumorales como extraños. Además, algunas células tumorales han desarrollado medios para escapar del sistema de defensa inmunitaria del hospedante, eliminando antígenos o reduciendo el número de receptores en la superficie de la célula.

El melanoma es un cáncer de piel maligno que se origina en los melanocitos. Si se detecta y trata de forma temprana, es curable casi al 100 por ciento. Sin un tratamiento temprano, el cáncer puede avanzar, se puede diseminar, y puede ser mortal. El melanoma es el cáncer de piel que provoca la mayoría de las muertes. El melanoma que se extiende superficialmente es el tipo más común de melanoma, especialmente entre personas jóvenes. Este melanoma afecta a la capa superior de la piel durante un tiempo bastante prolongado antes de penetrar de forma más profunda. El léntigo maligno se encuentra muy a menudo en personas ancianas que están expuestas crónicamente al sol. El melanoma lentiginoso acral asimismo se extiende superficialmente antes de penetrar de forma más profunda, y es el melanoma más común en afroamericanos y asiáticos, y el menos común entre caucásicos. El melanoma nodular es habitualmente invasivo en el momento en que se diagnostica por primera vez, y es la forma más agresiva de melanoma.

La leucemia es un cáncer de la sangre o de la médula ósea caracterizado por un aumento anormal de glóbulos blancos. La leucemia de células pilosas es una neoplasia hematológica poco común caracterizada por una acumulación de linfocitos B anormales en la médula ósea, que interfieren con la producción de glóbulos blancos normales, glóbulos rojos y plaquetas. La leucemia mieloide crónica (CML) es un cáncer de los glóbulos rojos caracterizado por el crecimiento incrementado y no regulado de células predominantemente mieloides en la médula ósea y la acumulación de estas células en la sangre. Los linfomas no de Hodgkin pueden ser agresivos o indolentes, pueden aparecer a cualquier edad, y a menudo están marcados por nodos de linfa que son más grandes que lo normal, fiebre, y pérdida de peso. Los linfomas no de Hodgkin de células B incluyen linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño (CLL/SLL), linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de células B precursoras, y

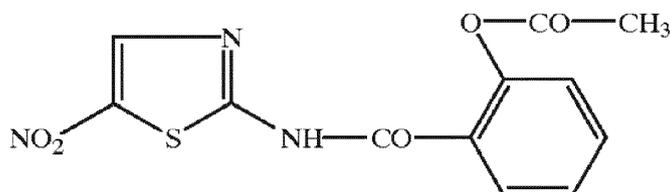
linfoma de células del manto. Los linfomas no de Hodgkin de células T incluyen micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, y linfoma linfoblástico de células T precursoras.

5 El carcinoma de células renales, que incluye carcinoma de células renales, carcinoma de pelvis renal y tumor de Wilms, es el tipo más común de cáncer de riñón en adultos. En 2010, hubo 58,240 nuevos casos estimados, y 13,040 muertes únicamente en los Estados Unidos de América.

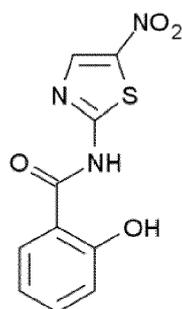
10 Aunque avances significativos a través de la biología molecular en la identificación de antígenos tumorales y su producción en forma recombinante y sintética han permitido muchos enfoques sofisticados en el tratamiento del cáncer, el éxito inmunogénico de las vacunas de células tumorales depende finalmente de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en células presentadoras de antígeno y el reconocimiento de antígenos tumorales como "extraños" por el sistema inmunitario del hospedante. Sin embargo, la prevención y tratamiento están impedidos por la capacidad de los patógenos para escapar de la respuesta inmunitaria del hospedante.

15 En consecuencia, existe una fuerte necesidad en la técnica del desarrollo de nuevas opciones profilácticas y de tratamiento para enfermedades víricas y cancerosas.

20 La nitazoxanida (2-(acetiloxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida) es un agente antiparasitario tiazolídico que presenta la siguiente estructura:



25 La tizoxanida es el metabolito circulante activo de nitazoxanida. Tras la administración oral de nitazoxanida o mezclas de nitazoxanida más tizoxanida en seres humanos, estos compuestos son absorbidos parcialmente desde el tubo intestinal, y la nitazoxanida es hidrolizada rápidamente para formar tizoxanida en plasma. La tizoxanida se une a las proteínas plasmáticas, y su semivida de eliminación urinaria es 7.3 horas. La tizoxanida está glucurononconjugada, y el fármaco se elimina en la orina y la bilis como tizoxanida o glucurónico de tizoxanida. La semivida de tizoxanida en plasma es solo aproximadamente 1.5 horas. La tizoxanida presenta la siguiente estructura:



35 La RM-4848 es una tiazolida sustituida que tiene la misma estructura que la tizoxanida, pero que incluye un grupo cloro que ha sustituido al grupo nitro, que da como resultado de esta manera el compuesto N-(5-clorotiazol-2-il)-2-hidroxibenzamida. La nitazoxanida (Alinia®, NTZ) y la tizoxanida (TIZ) son compuestos de tiazolida con actividad frente a parásitos, bacterias anaerobias, y virus. NTZ está aprobada en los Estados Unidos de América para el tratamiento de diarrea causada por *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*. NTZ y TIZ asimismo inhiben la replicación de los virus de ARN y de ADN, incluyendo virus de la gripe A y de la hepatitis C. En ensayos clínicos,

40 se mostró que NTZ es eficaz tratando la gastroenteritis por rotavirus, la gastroenteritis por norovirus, y la hepatitis C crónica, y está en desarrollo clínico de última etapa para el tratamiento de la gripe.

45 El documento US2010/330.173, la patente US nº 5.965.590, el documento US2010/260.797 y la patente US nº 5.589.038 describen el uso terapéutico de nitazoxanida, tizoxanida y algunos de sus derivados para el tratamiento de infecciones víricas, bacterianas o parasitarias.

Sumario de la invención

50 La invención proporciona la utilización de composiciones farmacéuticas que comprenden tiazolida para inmunomodular un sujeto que lo necesita, incluyendo el tratamiento de enfermedades víricas de la gripe. Asimismo

se describe un método para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de tiazolida. Los compuestos de tiazolida aceptables de la descripción incluyen aquellos descritos en las patentes US 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. El agente de tiazolida es nitazoxanida. El agente de tiazolida puede ser asimismo tizoxanida. Según la presente invención, el agente de tiazolida es RM-4848. Según la invención, el sujeto sufre una infección vírica de gripe. Asimismo se describe en la presente memoria un sujeto que está en riesgo de desarrollar una infección vírica, en el que la infección vírica es gripe. La gripe puede estar causada por un virus seleccionado de H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, y H10N7. Según la descripción, la infección vírica es hepatitis B. En una forma de realización preferida, el compuesto de tiazolida se administra solo. En otras formas de realización preferidas, el compuesto de tiazolida se administra en combinación con un inhibidor de neuraminidasa, tal como Laninamivir, Oseltamivir, Zanamivir o Peramivir, o un inmunoestimulante, tal como Imiquimod o Resiquimod, o un análogo de adamantina, o una proteína de fusión de sialidasa recombinante, o un fármaco contra la hepatitis B. En todavía otra forma de realización preferida, el compuesto de tiazolida se administra en combinación con una vacuna.

Según la descripción, el sujeto puede sufrir un cáncer, o está en riesgo de desarrollar un cáncer. El cáncer puede ser leucemia. Preferentemente, la leucemia es leucemia de células pilosas o leucemia mieloide crónica o melanoma o linfoma no de Hodgkin o carcinoma. El compuesto de tiazolida se administra solo. El compuesto de tiazolida asimismo se administra en combinación con una vacuna, o un inmunoestimulante, o un fármaco contra el cáncer. El fármaco contra el cáncer puede incluir STI571, CGP 74588, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Ara-C), doxorubicina, dacarbazina, cisplatino, bleomicina, vincristina, lomustina, vinblastina, carmustina, DTIC, tamoxifeno, sunitinib, sorafenib e interferón-α.

Asimismo se describe en la presente memoria que el sujeto sufre una infección por protozoos intracelulares, o está en riesgo de desarrollar una infección por protozoos intracelulares. La infección por protozoos intracelulares se selecciona de *Cryptosporidium* spp. *Leishmania* spp. *Toxoplasma gondii* *Trypanosoma cruzii*. El compuesto de tiazolida se administra solo.

El compuesto de tiazolida se administra en combinación con una vacuna, o un inmunoestimulante, o un fármaco antiprotozoico. El fármaco antiprotozoico puede incluir, pero no se limita a, trimetoprima/sulfametoxazol, atovacuona, clindamicina, pirimetamina, espiramicina, diminazina, homidio, suramina, melarsamina, estibogluconato sódico, y antimonio de meglumina.

El sujeto puede sufrir una infección bacteriana intracelular o está en riesgo de desarrollar una infección bacteriana intracelular. La infección bacteriana intracelular es *Mycobacterium tuberculosis*.

Asimismo se describe en la presente memoria un método para tratar o prevenir una infección vírica en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de tiazolida. El agente de tiazolida es nitazoxanida o tizoxanida o. En una descripción preferida, el agente de tiazolida es RM-4848, o un profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo. En un aspecto de la invención, la infección vírica es gripe. La gripe puede estar causada por un virus seleccionado de H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, y H10N7. La infección vírica es hepatitis B. La infección vírica asimismo puede ser diarrea o gastroenteritis causada por rotavirus o norovirus. El compuesto de tiazolida se administra solo o en combinación con un inhibidor de neuraminidasa, tal como Laninamivir, Oseltamivir, Zanamivir o Peramivir, o un inmunoestimulante, tal como Imiquimod o Resiquimod, o un análogo de adamantina, o una proteína de fusión de sialidasa recombinante, o un fármaco contra la hepatitis B. En todavía otra forma de realización preferida, el compuesto de tiazolida se administra en combinación con una vacuna.

Asimismo se describe un método para tratar o prevenir cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de tiazolida. El agente de tiazolida es nitazoxanida o tizosanida, o RM-4848. El cáncer es leucemia. Preferentemente, la leucemia es leucemia de células pilosas o leucemia mieloide crónica, o melanoma, o linfoma no de Hodgkin, o carcinoma de células renales. El compuesto de tiazolida se administra solo o en combinación con una vacuna, o un inmunoestimulante, o un fármaco contra el cáncer. El fármaco contra el cáncer puede incluir STI571, CGP 74588, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Ara-C), doxorubicina, dacarbazina, cisplatino, bleomicina, vincristina, lomustina, vinblastina, carmustina, DTIC, tamoxifeno, sunitinib, sorafenib e interferón-α.

Se describe además un método para tratar o prevenir infecciones de protozoos intracelulares en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de tiazolida, preferentemente nitazoxanida. El agente de tiazolida asimismo puede ser tizoxanida, o RM-4848. La infección por protozoos intracelulares es *Cryptosporidium* spp. El cáncer puede ser melanoma. La infección por protozoos intracelulares puede ser *Leishmania* spp. o *Toxoplasma gondii* o *Trypanosoma cruzii*. El compuesto de tiazolida se administra solo o en combinación con una vacuna, o un inmunoestimulante, o un fármaco antiprotozoico. El fármaco antiprotozoico puede incluir

trimetoprima/sulfametoxazol, atovacuona, clindamicina, pirimetamina, espiramicina, diminazina, homidio, suramina, melarsamina, estibogluconato sódico, y antimonio de meglumina.

5 En sujetos con inmunodeficiencias, la respuesta inmunitaria requerida para tratar o prevenir eficazmente una enfermedad vírica, un cáncer o una infección protozoaria o bacteriana intracelular puede no producirse por las tiazolidas usando el régimen de dosificación que se usa típicamente para tratar con éxito un sujeto con un sistema inmunitario totalmente competente. Los sujetos con inmunodeficiencias extremas pueden no ser buenos candidatos para el tratamiento con tiazolidas. Los sujetos con inmunodeficiencias moderadas pueden requerir mayores dosis de tratamiento con tiazolida, una dosificación más frecuente, o una dosificación durante un período de tiempo más largo que los sujetos con sistemas inmunitarios totalmente competentes. Los sujetos con infección por VIH que no han desarrollado inmunodeficiencias se pueden tratar eficazmente con tiazolidas, mientras que los sujetos con inmunodeficiencias asociadas con infección por VIH pueden requerir tratamiento con fármacos antirretrovirales para reducir el título vírico del VIH y restaurar parcialmente la función inmunitaria antes o simultáneamente con la terapia con tiazolida. De este modo, el uso de tiazolidas para estimular la respuesta inmunitaria se puede personalizar para los pacientes en base al estado inmunitario.

La descripción general anterior y la siguiente descripción breve de los dibujos y la descripción detallada son ejemplificativas y explicativas, y no están destinadas a proporcionar explicación adicional de la invención como se reivindica. Otros objetos, ventajas, y nuevas características resultarán evidentes para un experto en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

25 Las figuras 1A, 1B, y 1C son gráficas que expresan monocitos CD14+ en ausencia o presencia de diferentes dosis de tizoxanida en condiciones sin estimular y estimuladas con gripe. Se indican los valores medios, S.E. y los valores p.

30 Las figuras 2A, 2B, y 2C son gráficas que expresan la modulación por tizoxanida de la ruta de TLR en PBMC sin estimular y estimuladas con gripe, en ausencia o presencia de diferentes dosis de tizoxanida en condiciones sin estimular y estimuladas con gripe. Se indican los valores medios.

35 Las figuras 3A, 3B, y 3C son gráficas que expresan la modulación por tizoxanida de la ruta de IFN en PBMC sin estimular y estimuladas con gripe, en ausencia o presencia de diferentes dosis de tizoxanida en condiciones sin estimular y estimuladas con gripe. Se indican los valores medios.

Las figuras 4A y 4B son gráficas que expresan funciones auxiliares T en células T CD4+ que segregan IFN γ e IL2, en ausencia o presencia de diferentes dosis de tizoxanida en condiciones sin estimular y estimuladas con gripe. Se indican los valores medios, S.E. y los valores p.

40 Las figuras 5A, 5B, y 5C son gráficas que expresan funciones de célula T citotóxica. Células T CD8+ que expresan perforina, granzima, y Fas, en ausencia o presencia de diferentes dosis de tizoxanida en condiciones sin estimular y estimuladas con gripe. Se indican los valores medios, S.E. y los valores p.

45 Las figuras 6A, 6B, y 6C son gráficas que expresan el porcentaje de células CD14+ que expresan TLR3 (Fig. 6A), TLR7 (Fig. 6B) y TLR8 (Fig. 6C) en condiciones sin estimular y estimuladas con gripe. Se indican datos obtenidos en ausencia o en presencia de cinco dosis diferentes de RM4848 (0.5 μ g/ml; 1.0 μ g/ml; 10 μ g/ml; 20 μ g/ml; 40 μ g/ml). Se muestran los valores medios, S.E. y los valores p.

50 Las figuras 7A y 7B son gráficas que expresan la expresión de ARNm implicado en la ruta de señalización del receptor de tipo toll tras la estimulación con tres dosis diferentes de RM4848 (1.0 μ g/ml; 10 μ g/ml; 20 μ g/ml) en condiciones sin estimular (figura 7A) y estimuladas con gripe (figura 7B). La expresión de 84 genes implicados en la ruta de señalización del receptor de tipo Toll se ha evaluado mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, se ha calculado con respecto a cinco genes de mantenimiento, y se ha mostrado como la expresión, en número de veces de cambio, con respecto a la muestra sin estimular. Solamente se indican en la figura las dianas que muestran diferentes niveles de expresión tras la estimulación con tizoxanida.

60 Las figuras 8A y 8B son gráficas que expresan la expresión de ARNm implicado en la ruta de señalización de interferón tipo I tras la estimulación con tres dosis diferentes de RM4848 (1.0 μ g/ml; 10 μ g/ml; 20 μ g/ml) en condiciones sin estimular (figura 8A) y estimuladas con gripe (figura 8B). La expresión de 84 genes implicados en la ruta de señalización de interferón tipo I se ha evaluado mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, se ha calculado con respecto a cinco genes de mantenimiento, y se ha mostrado como expresión, en número de veces de cambio, con respecto a la muestra sin estimular. En la figura se indican solamente las dianas que muestran diferentes niveles de expresión tras la estimulación con tizoxanida.

65 Las figuras 9A y 9B son gráficas que expresan el porcentaje de células T CD4+ que segregan IFN γ (figura 9A)

e IL2 (figura 9B) en condiciones sin estimular y estimuladas con gripe. Se indican los datos obtenidos en ausencia o en presencia de cinco dosis diferentes de RM4848 (0.5 µg/ml; 1.0 µg/ml; 10 µg/ml; 20 µg/ml; 40 µg/ml). Se muestran los valores medios, S.E. y valores p.

5 Las figuras 10A, 10B, y 10C son gráficas que expresan una forma de realización de la invención, en las que se indica el porcentaje de células T CD8+ que expresan granzima (figura 10A), perforina (figura 10B) y Fas (figura 10C) en condiciones sin estimular y estimuladas con gripe. Se indican los datos obtenidos en ausencia o en presencia de cinco dosis diferentes de RM4848 (0.5 µg/ml; 1.0 µg/ml; 10 µg/ml; 20 µg/ml; 40 µg/ml). Se muestran los valores medios, S.E. y valores p.

10 La figura 11 muestra gráficas que expresan una forma de realización de la invención en la que la inhibición de la replicación del VIH-1: niveles de p24 en PBMC expuesta a VIH (Panel A) y el porcentaje de inhibición de la replicación del VIH (Panel B), en ausencia/presencia de diferentes dosis de tizoxanida (1.0 µg/ml; 10 µg/ml), se evalúan a 5 días tras la infección. Se indican los valores medios, S.E., y valores p.

15 Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Excepto que se especifique de otro modo, “un” o “una” significa “uno o más”.

20 Las composiciones y métodos de la presente invención o descritos en la presente memoria son para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita, previniendo y tratando de ese modo infecciones y/o enfermedades del cáncer. El objetivo es proporcionar métodos eficaces no invasivos para prevenir y tratar una infección vírica, una enfermedad cancerosa y/o enfermedades causadas por infecciones protozoarias intracelulares en un sujeto que lo necesita, estimulando una fuerte respuesta inmunitaria en el sujeto, que está

25 mediada tanto por el sistema inmunitario innato como por el adquirido.

El sistema inmunitario innato, que confiere defensa inmediata a corto plazo frente a la infección, proporciona el reclutamiento de fagocitos y especialmente neutrófilos en el sitio de inflamación, que a su vez estimula la liberación de leucocitos y linfocitos, con la producción concomitante de citocinas, incluyendo TNF, HMGB1 e IL-1. Los leucocitos innatos incluyen células asesinas naturales, mastocitos, eosinófilos, basófilos y fagocitos, incluyendo macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Los receptores de tipo Toll (TLRs) son componentes clave del sistema inmunitario innato, puesto que detectan la infección microbiana y accionan respuestas de defensa antimicrobianas del hospedante. Los TLRs controlan múltiples funciones de células dendríticas, y desencadenan la cascada que conduce a la respuesta del sistema inmunitario adquirido, incluyendo la producción de interferones tipo I (IFNs I). Los TLRs 3, 7, 8 y 9 están implicados en la detección vírica, y reconocen ácidos nucleicos patógenos. Los TLRs 7, 8 y 9 están situados en compartimientos endolisosómicos intracelulares.

El sistema inmunitario adquirido o adaptativo, que es accionado en vertebrados cuando un patógeno esquiva el sistema inmunitario innato, es responsable del reconocimiento de antígenos “no propios” específicos durante la presentación de antígenos, y de la respuesta inmunitaria dirigida a eliminar patógenos extraños o células infectadas con patógenos. En el sistema inmunitario adquirido, las células B están implicadas en la respuesta inmunitaria humoral, y las células T son responsables de las respuestas inmunitarias mediadas por células. La presentación de antígenos por las células dendríticas estimula a las células T para que se conviertan en células CD8+ “citotóxicas” o en células CD4+ “auxiliares”.

En los ganglios linfáticos, las células dendríticas presentan los antígenos “no propios” sobre su superficie acoplándolos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, asimismo conocido en seres humanos como antígeno leucocitario humano (HLA)), que es reconocido por las células T que pasan a través de los ganglios linfáticos. Los antígenos exógenos se presentan habitualmente sobre moléculas del MHC clase II, que activan células T auxiliares CD4+. Los antígenos endógenos producidos por virus que se replican dentro de una célula hospedante se presentan típicamente en moléculas del MHC clase I, y activan células T citotóxicas CD8+. El sistema inmunitario adquirido incluye células T citotóxicas, asimismo conocidas como TC, células T asesinas, o linfocito T citotóxico (CTL). Una vez que el receptor de células T (TCR) en las células T citotóxicas interacciona con una molécula del MHC clase I unida a péptido, el CTL se activa y se convierte en CTL efector, liberando citotoxinas, tal como perforina y granulinsina, que forman poros en la membrana plasmática de las células diana. La activación del CTL está regulada por linfocitos CD4+ o células T auxiliares. Las células T auxiliares expresan receptores de células T (TCR) que reconocen antígeno unido a moléculas de MHC clase II. Las células T auxiliares CD4+ efectoras pueden responder a una infección al desencadenar una respuesta de tipo Th1 o Th2. La respuesta Th1 conduce a inmunidad mediada por células, y se caracteriza por la producción de interferón-gamma, que activa macrófagos e induce a las células B para producir anticuerpos. La respuesta Th2 conduce a inmunidad humoral, y se caracteriza por la liberación de interleucina 4, con la activación consiguiente de células B y la producción de anticuerpos neutralizantes. En general, las respuestas Th1 son más eficaces frente a patógenos intracelulares, tales como virus y bacterias que están dentro de las células hospedantes, mientras que las respuestas Th2 son más eficaces frente a bacterias, parásitos y toxinas extracelulares.

En el contexto de la presente invención se descubrió que los efectos antivirales de los agentes de tiazolida, en

particular nitazoxanida, tizoxanida y RM-4848, o un profármaco de los mismos, resulta de la actividad inmunomoduladora de estos agentes, que son capaces de estimular una fuerte respuesta inmunitaria activando tanto el sistema inmunitario innato como el adquirido. En particular, en el contexto de la presente solicitud se descubrió que nitazoxanida, tizoxanida y RM-4848 estimulan la actividad de células T auxiliares y de CTL, la expresión de TLR7 y TLR8, y la respuesta de interferón tipo I, al inducir un incremento en: 1) células T CD4+ que segregan IFN γ e IL2, 2) la desgranulación de CTL, 3) células T CD8+ que expresan Fas, 4) monocitos que expresan TLR8, 5) la expresión de ARNm de IFN α e IFN β , 6) ARNm específico para genes inducibles por IFN tipo I (MXA, PRKCZ, ADAR, CXCL10, IRF1, PRKRA), y 7) ARNm específico para el gen implicado en la presentación del MHC de clase I (HLA-A, HLA-B, TAP1). En consecuencia, estos agentes de tiazolida se pueden usar para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que lo necesita, y en particular en sujetos que están en riesgo de desarrollar o que sufren una enfermedad en la que se necesita una fuerte respuesta inmunitaria, tal como infección vírica, un cáncer o una enfermedad causada por infección o infecciones protozoarias intracelulares. Adicionalmente, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para aliviar los síntomas de la enfermedad, o como una medida preventiva en un sujeto.

Los términos “sujeto” y “paciente” se usan de forma intercambiable, y pretenden referirse a cualquier mamífero, incluyendo seres humanos, que tiene, o está en riesgo de desarrollar, una infección vírica o una enfermedad cancerosa. El sujeto o paciente es típicamente humano; sin embargo, otros sujetos o pacientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, animales de laboratorio, tales como ratón, rata, conejo, o cobaya, animales de granja, y animales domésticos o mascotas. Asimismo se incluyen primates no humanos.

Como se usa en la presente memoria, los términos “tratar” y “tratamiento” se refieren a una reducción en la gravedad y/o frecuencia de síntomas, eliminación de síntomas y/o causa subyacente, prevención de la aparición de síntomas y/o de su causa subyacente (por ejemplo, terapia profiláctica), mejora o remedio del daño, o reducción en la intensidad de la infección.

Como se usa en la presente memoria, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad eficaz para provocar una respuesta celular que es clínicamente significativa.

Por “farmacéuticamente aceptable” se quiere decir un material que no es biológica o de otro modo indeseable, es decir, el material se puede incorporar en una composición farmacéutica y se puede administrar a un paciente sin provocar efectos biológicos indeseables o sin interactuar de manera dañina con cualquiera de los otros componentes de la composición en la que está contenido. Cuando la expresión “farmacéuticamente aceptable” se usa para referirse a un vehículo o excipiente farmacéutico, esto implica que el vehículo o excipiente ha satisfecho los estándares requeridos de ensayos toxicológicos y de fabricación, o que se incluye en el Inactive Ingredient Guide preparada por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de América.

Los métodos descritos en la presente memoria contemplan la administración de formulaciones que contienen compuestos de tiazolida. Los compuestos de tiazolida aceptables de la invención son aquellos descritos en las patentes US 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, 5.886.013. Los compuestos de tiazolida preferidos son nitazoxanida, tizoxanida o RM-4848, o su profármaco de éster, RM-5038. Se entiende que asimismo se conciben otros profármacos análogos u homólogos a RM-5038, y son una forma de realización de esta invención. Como se usa en la presente memoria, el término “tiazolida” se refiere a una tiazolida, un análogo de tiazolida, o una tiazolida sustituida. Como se usa en la presente memoria, el término “nitazoxanida” se refiere tanto a nitazoxanida (2-(acetilolixi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida) como a un análogo de nitazoxanida, por ejemplo a uno de los compuestos descritos en la patente US n^o 7.285.567 o en el documento US 2007/0167504. Como se usa en la presente memoria, el término “tizoxanida” se refiere a tizoxanida, un análogo de tizoxanida, o una tizoxanida sustituida. Nitazoxanida, tizoxanida, RM-4848 o cualquiera de los análogos de tiazolida se pueden administrar en forma del compuesto per se, y/o, cuando sea adecuado, en forma de una sal, polimorfo, éster, amida, profármaco, derivado, o similar, con la condición de que la sal, polimorfo, éster, amida, profármaco o derivado sea farmacológicamente adecuado. Tales sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de estos agentes activos se pueden preparar usando procedimientos estándar conocidos por un experto en la materia de química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, por J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, 4^a Ed. (Nueva York: Wiley-Interscience, 1992). La cantidad total de nitazoxanida o tizoxanida en las composiciones de la invención es típicamente alrededor de 60% a 75% en peso de la composición. Las composiciones se pueden formular para liberación inmediata, liberación controlada, o liberación sostenida. Las composiciones pueden contener uno o más aditivos o excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables. Estos excipientes son ingredientes terapéuticamente inertes que son bien conocidos y apreciados en la técnica. Como se usa en la presente memoria, la expresión “ingrediente inerte” significa aquellos ingredientes terapéuticamente inertes que son bien conocidos en la técnica de la ciencia farmacéutica, que se pueden usar de forma individual o en diversas combinaciones, e incluyen, por ejemplo, diluyentes, disgregantes, aglutinantes, agentes de suspensión, deslizantes, lubricantes, cargas, agentes de revestimiento, 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, 19^a edición, Easton, Pa.

Los ejemplos de diluyentes o cargas incluyen, pero no se limitan a, almidón, lactosa, xilitol, sorbitol, azúcar glass, azúcar compresible, dextratos, dextrina, dextrosa, fructosa, lactitol, manitol, sacarosa, talco, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato cálcico dibásico o tribásico, fosfato dicálcico deshidratado, sulfato de calcio, y similares. La cantidad de diluyentes o cargas puede estar en un intervalo entre alrededor de 2% y alrededor de 15% en peso de toda la composición.

Los ejemplos de disgregantes incluyen, pero no se limitan a, ácido algínico, ácido metacrílico DVB, PVP reticulada, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, pregelatinizado potásica, glicolato de almidón sódico, almidón, incluyendo almidón de maíz, almidón pregelatinizado, y similar. El disgregante o disgregantes representan típicamente alrededor de 2% a alrededor de 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 sódica; gomas naturales como goma arábiga, ácido algínico, goma guar; glucosa líquida, dextrina, povidona, jarabe, polióxido de etileno, polivinilpirrolidona, poli-N-vinilamida, polietilenglicol, gelatina, polipropilenglicol, tragacanto, y similares. La cantidad de aglutinantes es alrededor de 0.2% a alrededor de 14% en peso de toda la composición.

Los ejemplos de deslizantes incluyen, pero no se limitan a, dióxido de silicio, sílice anhidra coloidal, trisilicato de magnesio, fosfato cálcico tribásico, silicato de calcio, silicato de magnesio, dióxido de silicio coloidal, celulosa en polvo, almidón, talco, y similares. La cantidad de deslizante o deslizantes es alrededor de 0.01% a alrededor de 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 cinc, ácido esteárico, polietilenglicol, behenato de glicerilo, aceite mineral, estearilfumarato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado, y similares. La cantidad de lubricante o lubricantes es alrededor de 0.2% a alrededor de 0.1% 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 vendidos por Dow Chemical con el nombre comercial "Methocel®" (por ejemplo, Methocel E50LV®, Methocel K100LV®, y Methocel F50LV®), y polímeros de hidroxietilcelulosa de baja viscosidad. El polímero de baja viscosidad está presente típicamente en alrededor de 10% a alrededor de 20%, o alrededor de 10% a alrededor de 15%, o preferentemente alrededor de 12%, del peso total de toda la composición, o, en aquellas formas de realización que tienen porciones de liberación controlada y de liberación inmediata, el polímero de baja viscosidad en la porción de liberación controlada está presente típicamente en alrededor de 15% a alrededor de 20%, preferentemente alrededor de 18%, del peso de la porción de liberación controlada.

Las composiciones pueden comprender además un material de revestimiento. El material de revestimiento está presente típicamente como una capa externa sobre la forma de dosificación, que cubre completamente la formulación. Por ejemplo, en algunas formas de realización, 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 sobre la primera capa para formar un comprimido de núcleo. En tales formas de realización, por ejemplo, el material de revestimiento puede estar en forma de una capa de revestimiento externa que se deposita sobre el comprimido de núcleo. El material de revestimiento es típicamente alrededor de 1% a alrededor de 5% en peso de la composición, y puede comprender hidroxipropilmetilcelulosa y/o polietilenglicol, y uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en agentes de revestimiento, opacificantes, agentes que enmascaran el sabor, cargas, agentes que dan barniz, agentes colorantes, agentes contra la pegajosidad, y similares. Los ejemplos de sustancias de revestimiento de tipo película y los métodos para usar tales sustancias de revestimiento son bien conocidos por un experto en la materia.

Las presentes composiciones se pueden usar eficazmente para estimular el sistema inmunitario en un sujeto que lo necesita, tratando de ese modo una infección de gripe vírica. La infección vírica es gripe, en particular una gripe causada por un virus seleccionado de H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3, y H10N7, o hepatitis B, o diarrea o gastroenteritis provocados por rotavirus o norovirus. Asimismo se describe que la composición puede tratar o prevenir un cáncer, que puede ser leucemia, incluyendo leucemia de células pilosas y leucemia mieloide crónica, melanoma, linfoma no de Hodgkin, o carcinoma de células renales. Otras enfermedades descritas son la enfermedad causada por infección de protozoos intracelulares que pueden ser *Cryptosporidium* spp., *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzii*, o la enfermedad causada por infección bacteriana intracelular, que puede ser *Mycobacterium tuberculosis*. Las composiciones se pueden administrar durante cualquier período de tiempo adecuado para tratar eficazmente una infección de gripe vírica. Para las composiciones se pueden usar cualquier dosificación y régimen apropiados. La administración se puede llevar a cabo típicamente a lo largo de un período de alrededor de 3 días hasta alrededor de 104 semanas, pero se puede llevar a cabo a lo largo de un período mayor que 104 semanas, e incluso se puede llevar a cabo indefinidamente. Los regímenes apropiados pueden ser determinados por el médico.

Los compuestos de tiazolida se pueden administrar solos o en combinación con uno o más agentes activos adicionales, incluyendo un inhibidor de neuraminidasa, tal como Laninamivir, Oseltamivir, Zanamivir o Peramivir, un inmunoestimulante, tal como Imiquimod o Resiquimod, un análogo de adamantina, y una proteína de fusión de sialidasa recombinante. Los compuestos de tiazolida asimismo se pueden administrar solos o en combinación con uno o más agentes activos adicionales, incluyendo un fármaco antiprotozoico. El fármaco antiprotozoico puede incluir, pero no se limita a, trimetoprima/sulfametoxazol, atovacuona, clindamicina, pirimetamina, espiramicina, diminazina, homidio, suramina, melarsamina, estibogluconato sódico, y antimoniato de meglumina. Los compuestos de tiazolida se pueden administrar profilácticamente en combinación con una vacuna, o en combinación con un agente contra el cáncer. El agente contra el cáncer puede incluir, pero no se limita a, STI571, CGP 74588, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina (Ara-C), doxorubicina, dacarbazina, cisplatino, bleomicina, vincristina, lomustina, vinblastina, carmustina, DTIC, tamoxifeno, sunitinib, sorafenib e interferón-α. La composición y el agente activo adicional (por ejemplo, un interferón) se pueden administrar simultáneamente, o separadamente, a la vez, o en composiciones diferentes (incluyendo en composiciones separadas que varían en forma de dosificación, perfiles de liberación, y similar).

En sujetos con inmunodeficiencias, la respuesta inmunitaria requerida para tratar o prevenir eficazmente una enfermedad vírica, cáncer o infección protozoaria o bacteriana intracelular puede no producirse por las tiazolidas usando el régimen de dosificación que se usa típicamente para tratar con éxito un sujeto con un sistema inmunitario totalmente competente. Los sujetos con inmunodeficiencias extremas pueden no ser buenos candidatos para el tratamiento con tiazolidas. Los sujetos con inmunodeficiencias moderadas pueden requerir mayores dosis de tratamiento con tiazolida, una dosificación más frecuente, o una dosificación durante un período de tiempo más prolongado que los sujetos con sistemas inmunitarios totalmente competentes. Los sujetos con infección por VIH que no han desarrollado inmunodeficiencias se pueden tratar eficazmente con tiazolidas, mientras que los sujetos con inmunodeficiencias asociadas con infección por VIH pueden requerir tratamiento con fármacos antirretrovirales para reducir el título vírico del VIH y restaurar parcialmente la función inmunitaria antes o simultáneamente con terapia con tiazolida. De este modo, el uso de tiazolidas para estimular la respuesta inmunitaria se puede personalizar para pacientes en base al estado inmunitario.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de células

Las células mononucleares de la sangre tienen un papel importante en el sistema de respuesta inmunitaria, puesto que producen diferentes citocinas en respuesta a infecciones patógenas. En consecuencia, los efectos inmunomoduladores de tizoxanida (TIZ) en células mononucleares de sangre periférica (PMBCs) obtenidas de diez (10) donantes sanos y aisladas mediante centrifugación en Ficoll-Paque. Las PMBCs se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero humano en presencia o ausencia de tres dosis diferentes de TIZ (0.5, 1.0 y 10 mg/ml) en condiciones tanto sin estimular como estimuladas con gripe.

Ejemplo 2: Análisis inmunológicos

Las PMBCs sin estimular y estimuladas se analizaron para determinar la actividad de células T auxiliares y de CTL, así como para determinar la expresión de TLR7 y TLR8 y las respuestas de IFN tipo I, en ausencia o presencia de diferentes dosis de tizoxanida. Los análisis inmunológicos fueron como sigue:

Las funciones auxiliares T se detectaron determinando la cantidad de células T CD4+ que segregan IFN γ e IL-2. La actividad de CTL se detectó determinando la cantidad de células T CD8+ que expresan perforina, granzima y Fas.

La expresión de TLR se detectó midiendo monocitos CD14+ que expresan TLR8, TLR7 y TLR3. La modulación de la ruta de TLR por tizoxanida se detectó mediante análisis de interferón (IFN) tipo I humano mediante matriz de PCR.

Específicamente, los efectos inmunomoduladores de TIZ se determinaron en PMBCs sin estimular y estimuladas con gripe analizando lo siguiente:

• Interferón (IFN) tipo I humano y ruta de TLR (matriz de PCR):

Interferones: Ligandos para receptores de interferón-alfa e interferón-beta: IFNA1, IFNA4, IFNB1, IFNK, IFNW1. Ligandos para receptores de interferón-gamma: IFNG. Ligandos para receptores de citocinas (dominio D200) de clase hematopoyetina e interferón: IFNA14, IFNA2, IFNA21, IFNA5, IFNA6, IFNA8, IFNE1, IL15. Otros genes relacionados con interferones: IFRD1, IFRD2, IL28A, IL29, IL6.

Receptores de interferón: Receptores de interferón-alfa e interferón-beta: IFNAR1, IFNAR2. Receptores de interferón-gamma: IFNGR1, IFNGR2. Otros receptores de citocinas (dominio D-200) de clase hematopoyetina e interferón: CNTFR, CRLF2, CSF2RA, CSF3R, EBB, F3, IL20RB (FNDC6), IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12B,

IL13RA1, IL20RA, IL21R, IL22RA2, IL28RA, IL2RB, IL2RG, IL31RA, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL9R, LEPR, MPL, TTN.

Factores reguladores de interferón: Reguladores transcripcionales: IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8. Otras proteínas reguladoras de interferón: IRF2BP1, IRF2BP2. Proteínas inducibles por interferón: Genes implicados en la respuesta a virus: ISG15 (G1P2), IFI16, IFI35, IFI44, IFIH1, MX1, OAS1. Reguladores transcripcionales: IFI16, SP110. Otros genes inducibles por interferón: ADAR, CXCL10, IFI6 (G1P3), IFI27, IFI30, IFI44L, IFIT1, IFIT1L, IFIT2, IFIT3, IFITM1, IFITM2, IRGM, PSME1, PYHIN1.

• Receptores de tipo Toll: LY64, SIGIRR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10.

Adaptadores y proteínas que interactúan con TLR: BTK, CD14, HMGB1, HRAS, HSPA1A, HSPD1, LY86 (MD-1), LY96 (MD-2), MAPK8IP3, MYD88, PELI1, RIPK2, SARM1, TICAM2, TIRAP, TOLLIP, TRIF.

Efectores: CASP8, EIF2AK2, FADD, IRAK1, IRAK2, MAP3K7 (TAK1), MAP3K7IP1 (TAB1), NR2C2, PPARA, PRKRA, SITPEC, TRAF6, UBE2N, UBE2V1.

Rutas aguas abajo y genes diana: Ruta de NF κ B: CCL2, CHUK, CSF2 (GMCSF), CSF3 (GCSF), IFNA1, IFNB1, IFNG, IKKB, IL1A, IL1B, IL2, IL6, IL8, IL10, IL12A, LTA, MAP3K1, MAP4K4, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIL1, NFRKB, REL, RELA, TNF, TNFRSF1A.

Ruta de JNK/p38: ELK1, FOS (c-Fos), JUN, MAP2K3, MAP2K4 (JNKK1), MAP3K1 (MEKK), MAPK8 (JNK1).

Ruta de NF/IL6: CLECSF9, PTGS2.

Ruta de IRF: CXCL10, IFNA1, IFNB1, IFNG, IRF1, IRF3, TBK1.

Regulación de la inmunidad adaptativa: CD80, CD86, RIPK2, TRAF6.

Ejemplo 3: Efectos inmunomoduladores de tizoxanida

TIZ mostró efectos inmunomoduladores potentes induciendo un incremento en: 1) células T CD4+ que segregan IFN γ e IL2 (figuras 4A y 4B); 2) la desgranulación de CTL (figura 5B); 3) células T CD8+ que expresan Fas (figura 5C); 4) expresión de TLR3, TLR8 y TLR7 en monocitos (figuras 1A-C); 5) expresión de ARNm de IFN α e IFN β (figura 3A), 6) ARNm específico para genes inducibles por IFN tipo I (MXA, PRKCZ, ADAR, CXCL10, IRF1, PRKRA) (figura 3B); y 7) ARNm específico para el gen implicado en la presentación del MHC de clase I (HLA-A, HLA-B, TAP1) (figura 3C).

Estos resultados demuestran claramente que TIZ tiene actividad inmunomoduladora extraordinaria y estimula una fuerte respuesta inmunitaria, que está mediada tanto por el sistema inmunitario innato como por el adquirido.

Ejemplo 4: Expresión de TLR en monocitos

La expresión de TLR3, TLR7 y TLR8 se evaluó en células CD14+ (monocitos), tanto en condiciones sin estimular como estimuladas con gripe. RM-4848 indujo un incremento en el porcentaje de células CD14+ que expresan TLR7, en comparación con el control, con la estimulación antigénica por gripe (dosis de 1.0 μ g/ml: p = 0.001; dosis de 10 μ g/ml: p = 0.023), mientras que no se observaron diferencias significativas en la condición sin estimular. No hubo ningún efecto sobre células CD14+ que expresan TLR3 y TLR8 para las cinco dosis ensayadas tanto en condiciones sin estimular como estimuladas con gripe (figuras 1A, 1B y 1C).

Ejemplo 5: Ruta de TLR y RM-4848

Para determinar si un efecto ejercido por RM-4848 sobre la expresión de TLR depende de una modulación diferencial de las rutas de transducción asociadas a TLR, se usó una matriz de PCR en tiempo real, que criba la expresión de 84 genes que están implicados en la activación de la ruta de TLR. Los datos obtenidos en PBMC sin estimular, tras 3 horas de incubación con RM-4848, muestran que solamente 3 de los 84 genes están aumentados con un incremento de aproximadamente 5 veces de IL1A e IL1B y un incremento de 6 veces de la IL6 a la dosis de 20 μ g/ml como se indica en la figura 2A.

Los datos obtenidos en PBMC estimulada con gripe, tras 3 horas de incubación con RM-4848, muestran que solamente 7 de los 84 genes estaban aumentados, como se muestra en la figura 2B. A la dosis de 1 μ g/ml, hubo aproximadamente un incremento de 6 veces de INFA1 e INFB1, y un incremento de 7 veces en TLR3 y TLR5, un incremento de 6 veces para TLR9, pero a la dosis de 20 μ g/ml, mientras que TLR-7 y TLR8 estuvieron ligeramente por encima del valor de referencia de 2 veces para todas las dosis ensayadas.

Ejemplo 6: Rutas de IFN y RM-4848

Para determinar si los incrementos en los niveles de expresión de interferón tipo I en PBMC incubada con RM-4848 pudieron influir en la expresión de genes inducibles por interferón, se usó una matriz de PCR en tiempo real que criba la expresión de 84 genes que están implicados en la respuesta de interferón alfa y beta.

Los resultados de los análisis realizados en PBMC sin estimular incubada con RM-4848 mostraron que ninguno de los 84 genes ensayados estaban aumentados; por el contrario, 16 genes estaban disminuidos. En particular, se dio a conocer una disminución de 20 veces para INFA1, una disminución de 15 veces para INFA2 e INFB1, y una disminución de 10 veces en INFA4 a la dosis elevada de 20 $\mu\text{g/ml}$. Estos efectos reductores no se observaron a las dos dosis menores de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ (figura 3A).

Los resultados de los análisis realizados en PBMC estimulada con gripe incubada con RM-4848 mostraron que 12 de los 84 genes ensayados estaban aumentados. Los datos obtenidos en PBMC estimulada con gripe, tras 3 horas de incubación con RM-4848, mostraron un incremento de 10 veces para INFA1 e INFA4, un incremento de 8 veces para INFB1, y un incremento de 6 veces para IFNA2, a la dosis baja de 1 $\mu\text{g/ml}$. Los tres niveles de dosis aumentaron moderadamente los ISGs (genes estimulados por interferón), IFI27 e IFIT1, con un efecto más pronunciado a la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ (> 4 veces) (figura 3B).

Ejemplo 7: Funciones auxiliares T y RM-4848

Se evaluó la producción de IFN- γ e IL2 por células T CD4+ tanto en condición basal como tras la estimulación con antígenos específicos de la gripe. La dosis baja de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de RM-4848 indujo un aumento estadísticamente significativo en la producción de IFN- γ en células sin estimular ($p = 0.035$) y en condiciones estimuladas ($p = 0.050$) (figura 4A). Se observó una tendencia similar en células T CD4+ que segregan IL2, tanto en condiciones sin estimular (dosis de 0.5 $\mu\text{g/ml}$: $p = 0.047$) como estimuladas con gripe (dosis de 0.5 $\mu\text{g/ml}$: $p = 0.037$) (figura 4B).

Ejemplo 8: Actividad de CTL y RM-4848

Se analizaron células T CD8+ que expresan granzima, perforina y Fas, en condición sin estimular y con la estimulación con antígenos de la gripe. RM-4848, a los tres niveles de dosis mayores ensayados, indujo una desgranulación de los CTLs, evaluada por la reducción en la expresión de perforina (figura 5B). El porcentaje de células T CD8+ que expresan Fas asimismo aumentó estadísticamente de forma significativa en presencia de las dosis mayores de 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de RM-4848 en condiciones tanto sin estimular ($p = 0.006$) como estimuladas ($p = 0.003$) (figura 5C).

A partir de los Ejemplos 4-8, se aprecia un aumento y activación de TLR, especialmente de forma directa con TLR7, que da como resultado un incremento selectivo de la producción de interferón (IFN- α , IFN- β) tipo I, con la activación subsiguiente de rutas de genes estimulados por interferón (ISG). Más específicamente, los genes inducibles por IFN tipo I (CD70, COL16A1, HSPA1L, IFI27, IFIT1, NRG1 y SHB) están aumentados. Estos genes están implicados todos ellos en el control de la replicación vírica. RM4848 activa al mismo tiempo linfocitos T CD4+ y CD8+. En particular, en linfocito T CD4+ existe un aumento de la producción de IFN- γ e IL-2, mientras que en células T CD8+ son inducidas a desgranularse, consistente con una activación de la inmunidad mediada por células.

Estos resultados apoyan la actividad antiviral de amplio espectro de RM4848, que estimula al sistema inmunitario a combatir la infección vírica. Es particularmente notable que el fármaco no solo está estimulando una respuesta inmunitaria innata probablemente responsable de limpiar la mayoría de las infecciones antes de que provoquen una enfermedad perceptible, incluso si muchos patógenos han desarrollado mecanismos para obstruir su detección. Desde un punto de vista clínico, se sugeriría que RM4848, y probablemente las otras tiazolidas con un perfil inmunoestimulante similar, se podría usar para prevenir enfermedades o para limitar la diseminación de una enfermedad. La actividad de RM4848 frente a la inmunidad adaptativa no solo es notable debido a que además alcanza su efecto frente a la inmunidad innata, sino asimismo debido a que es el mecanismo mediante el cual se curan las enfermedades víricas. La inmunidad adaptativa se basa en linfocitos, que tienen un único tipo de receptores pero un repertorio esencialmente ilimitado de variantes que reconocen antígenos, un término definido operacionalmente que refleja su versatilidad. Además de las producciones de varios linfocitos, auxiliares o asesinos, culminan con la producción de anticuerpos por las células B. Si la inmunidad adaptativa se retrasa hasta unos pocos días con el comienzo de una infección específica, su acción a la hora de producir partículas tóxicas frente al patógeno, y el desarrollo de memoria inmunitaria, son un mecanismo antivírico poderoso que el observado con inmunidad innata, aunque ambos son necesarios y están interrelacionados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de tiazolida, en la que el compuesto de tiazolida es N-(5-clorotiazol-2-il)-2-hidroxibenzamida, o una sal del mismo, para una utilización en la estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que necesita la misma, en la que el sujeto sufre una infección vírica de gripe, en la que la estimulación de la respuesta inmunitaria da como resultado el tratamiento de la infección vírica de gripe en el sujeto.
- 10 2. Composición para una utilización según la reivindicación 1, en la que el compuesto de tiazolida se administra en combinación con una vacuna, un inmunoestimulante, un inhibidor de neuraminidasa, un análogo de adamantina o una proteína de fusión de sialidasa recombinante.
- 15 3. Composición para una utilización según la reivindicación 1, en la que la infección vírica de gripe está provocada por un virus seleccionado de entre H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 y H10N7.

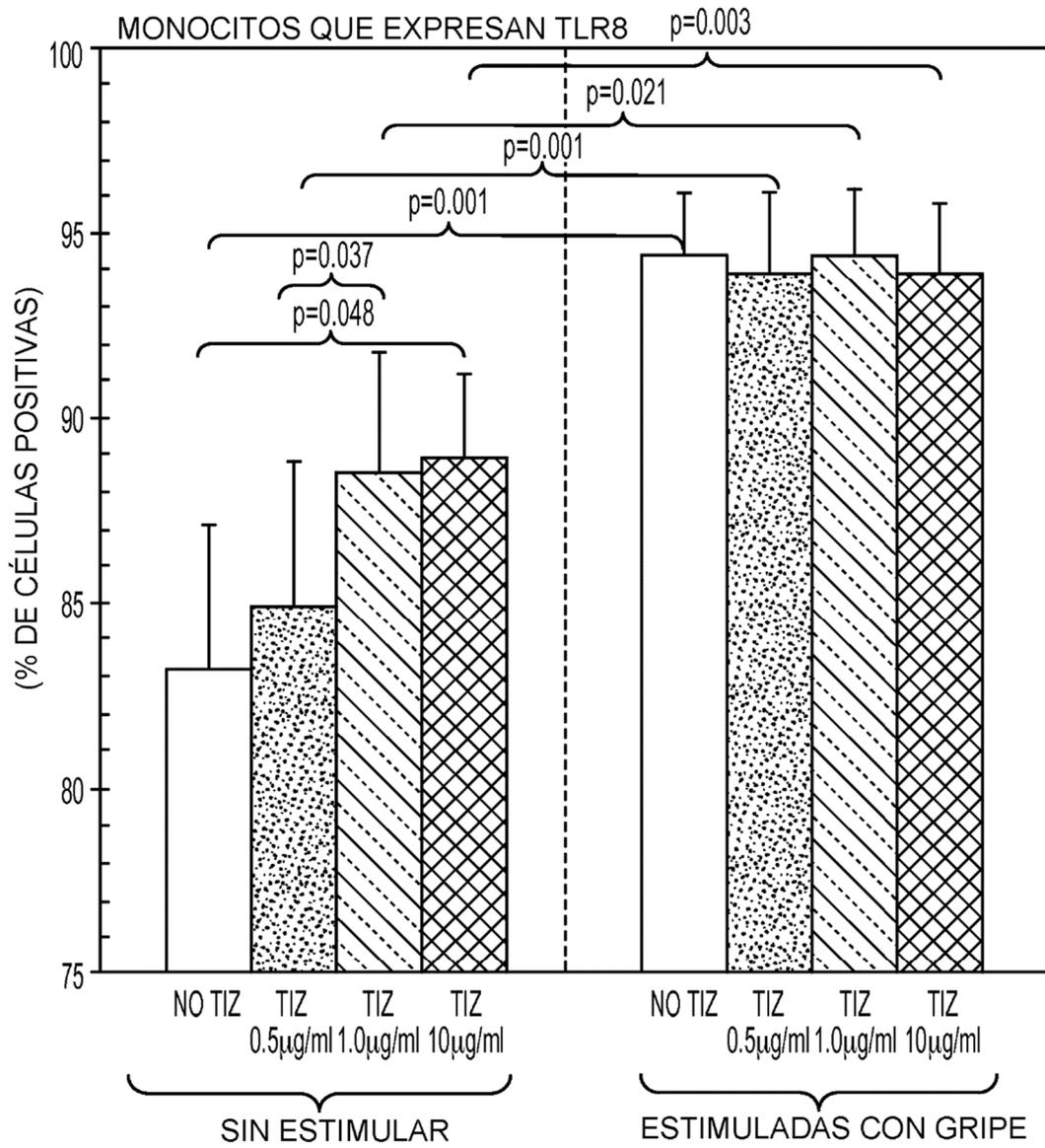


FIG. 1A

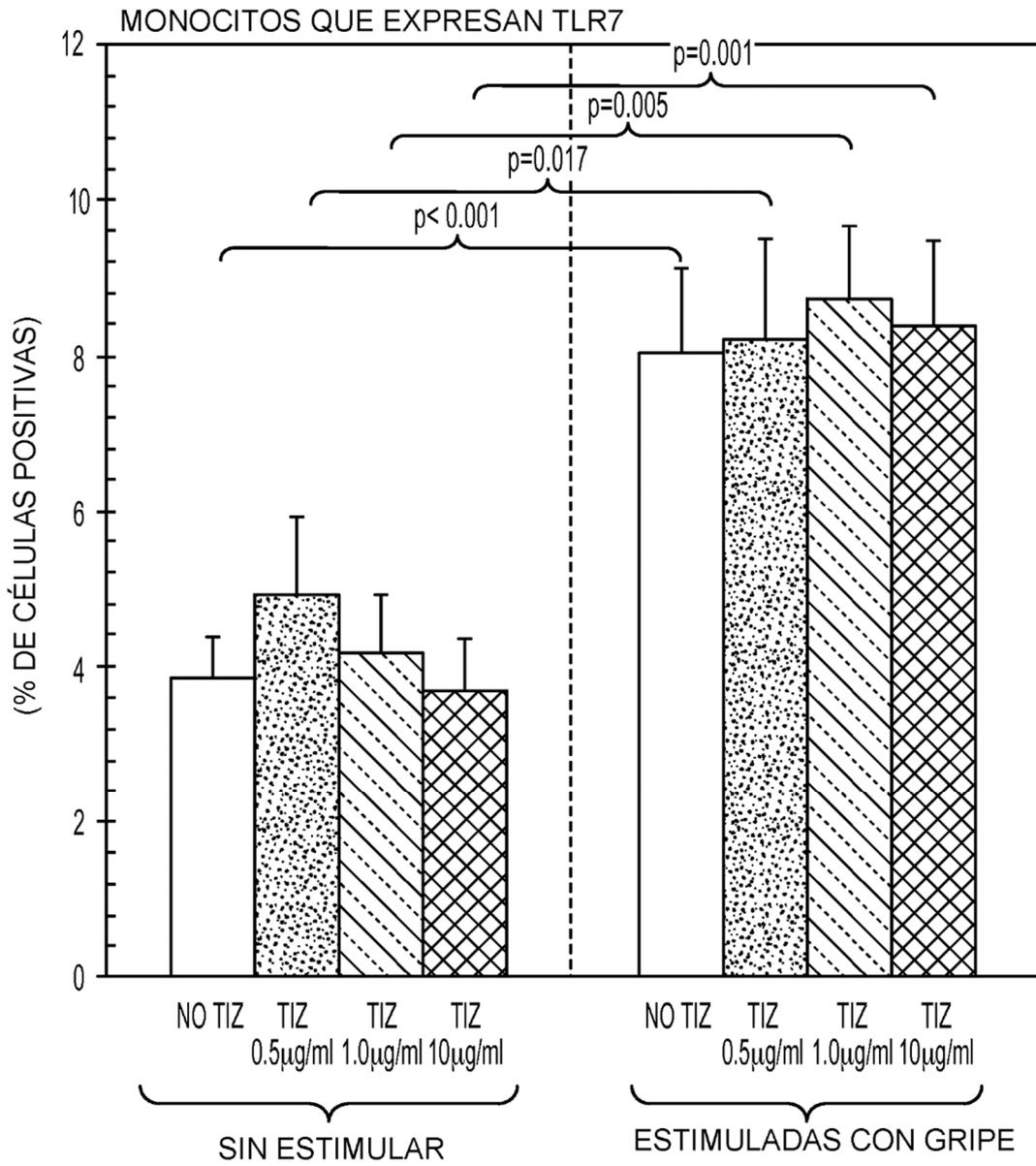


FIG. 1B

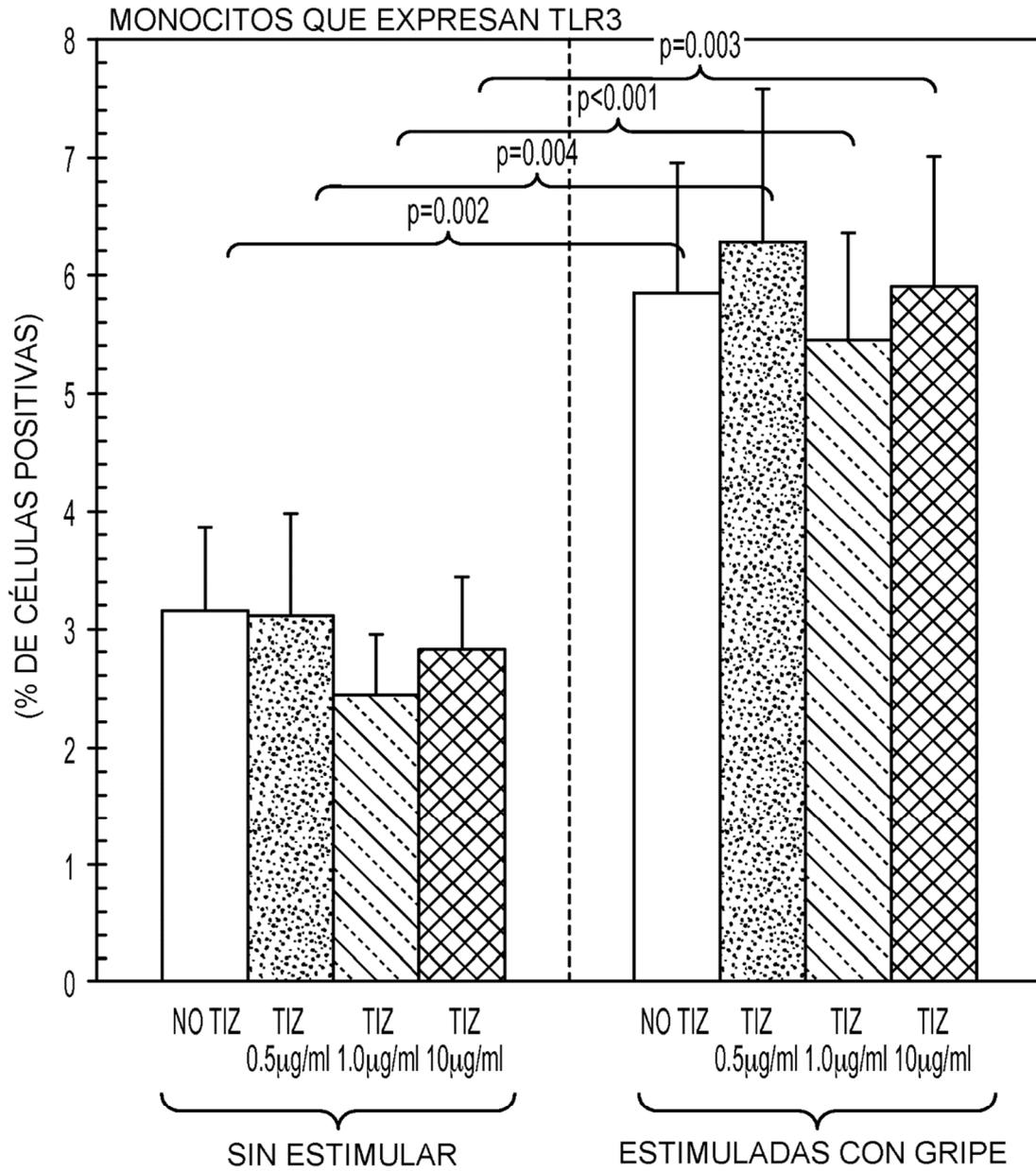


FIG. 1C

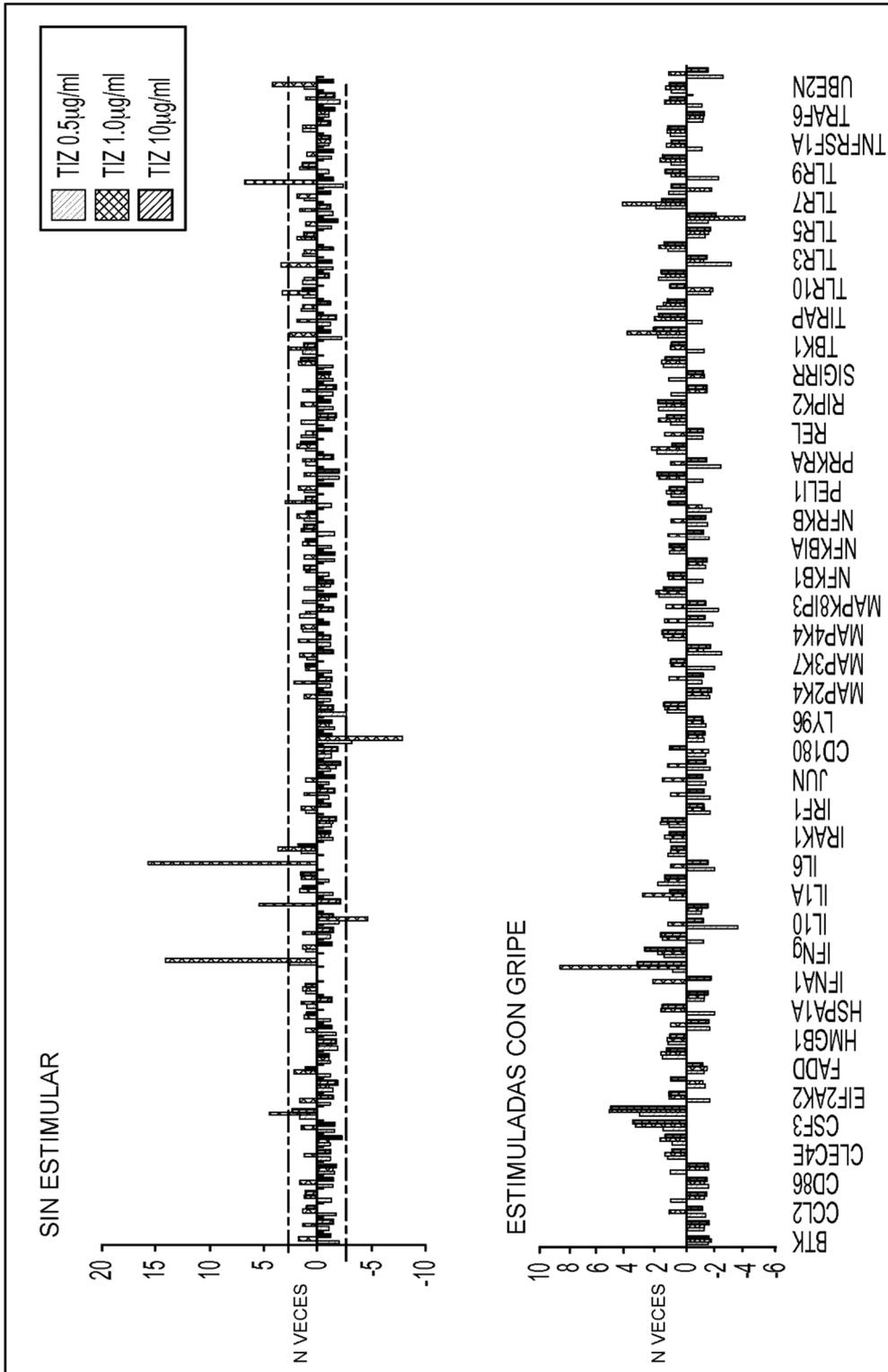


FIG. 2A

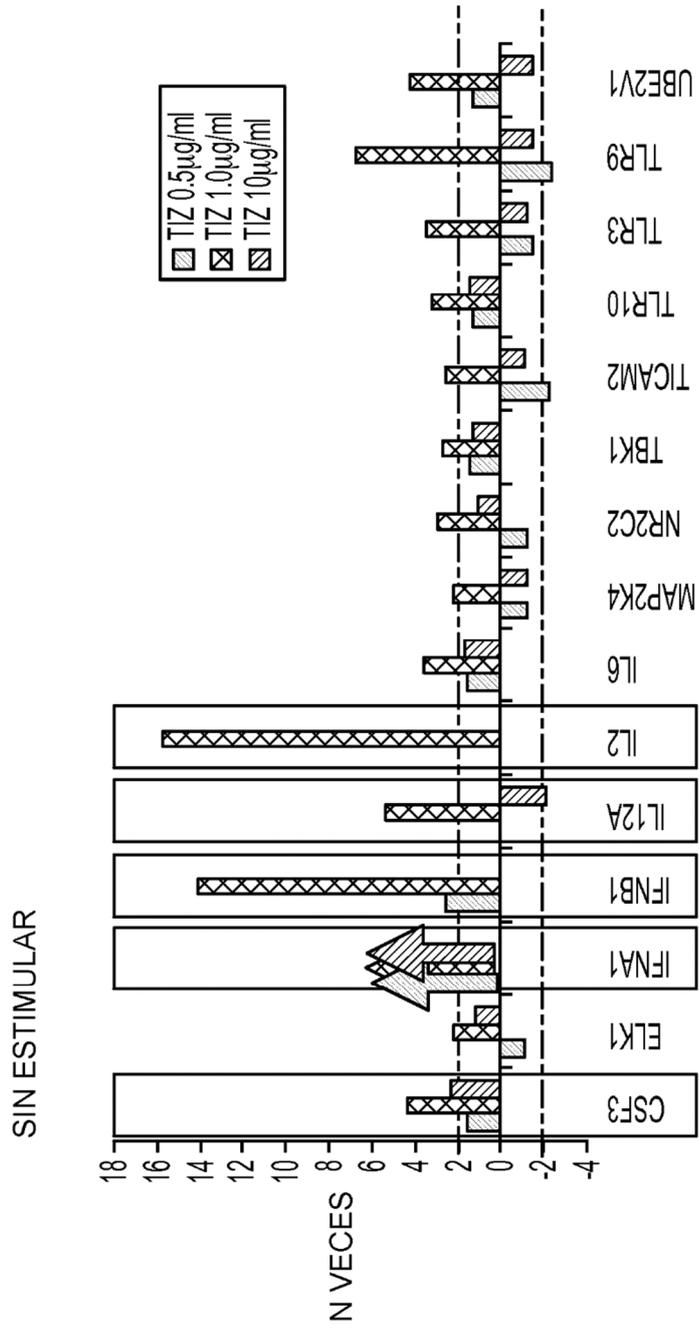


FIG. 2B

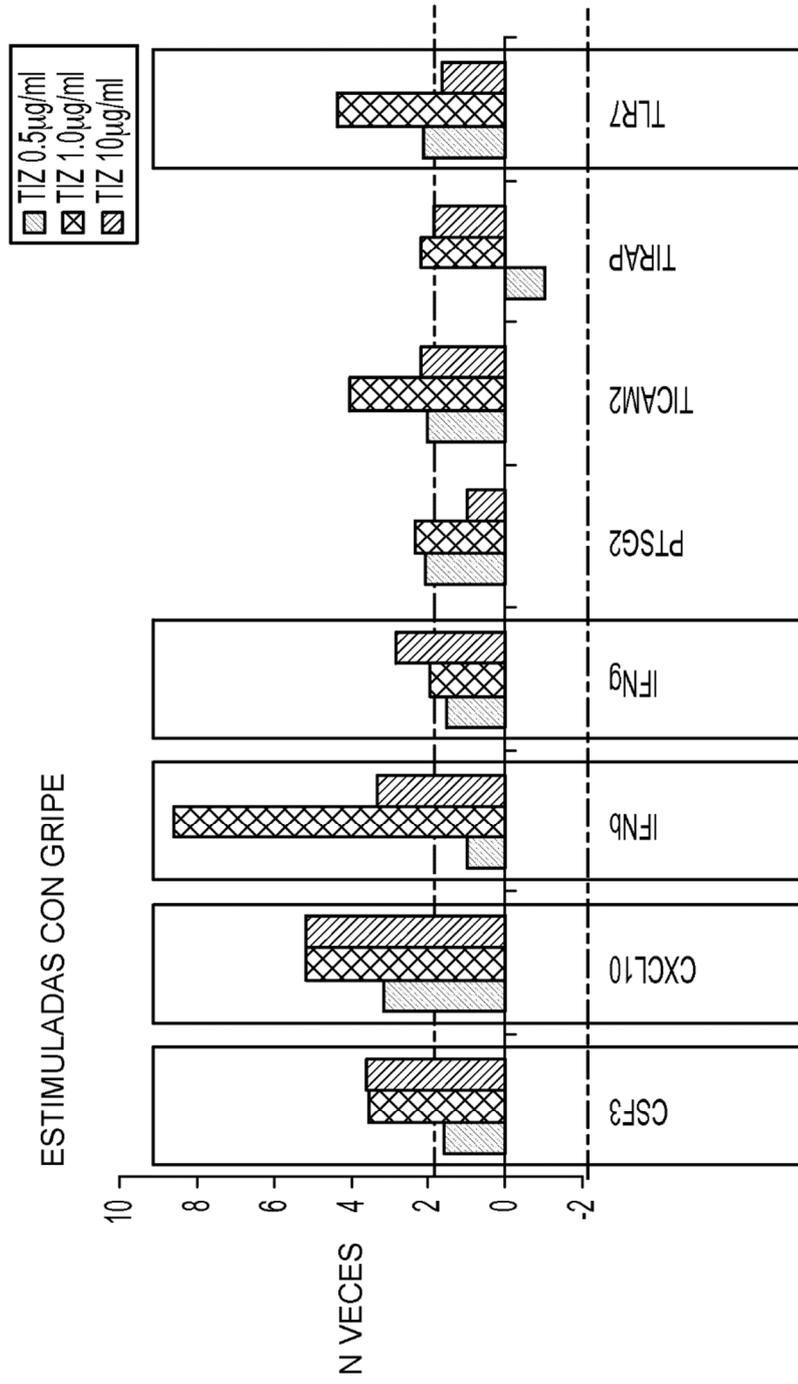


FIG. 2C

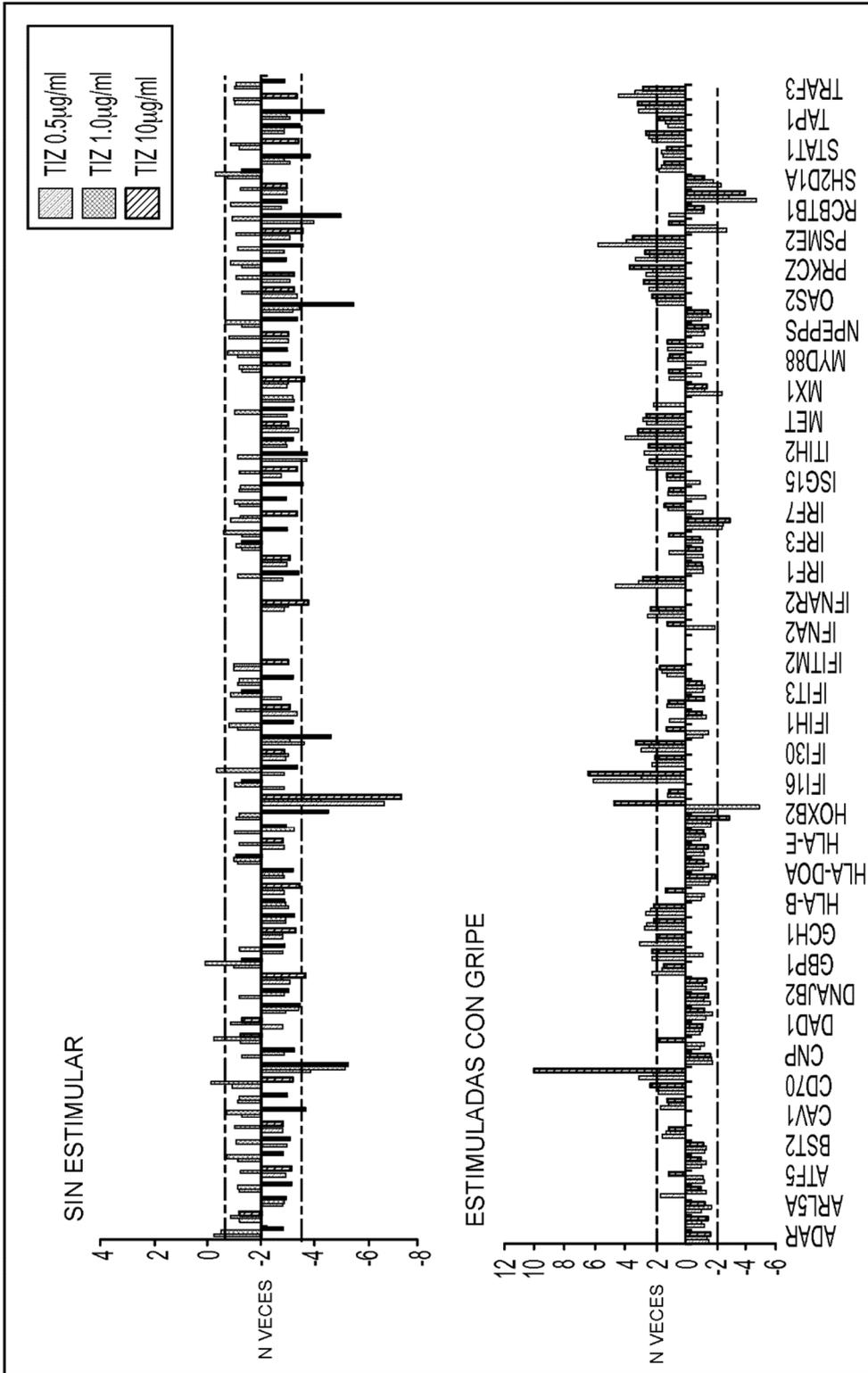


FIG. 3A

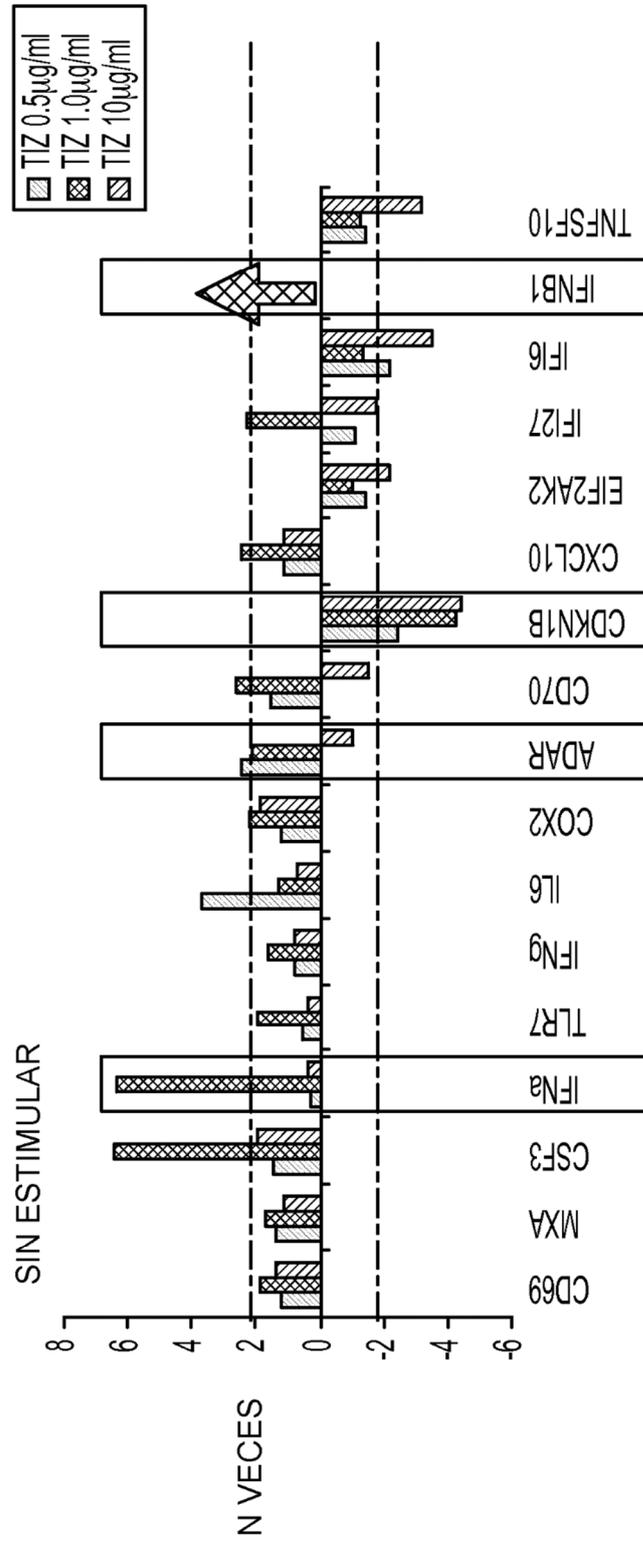


FIG. 3B

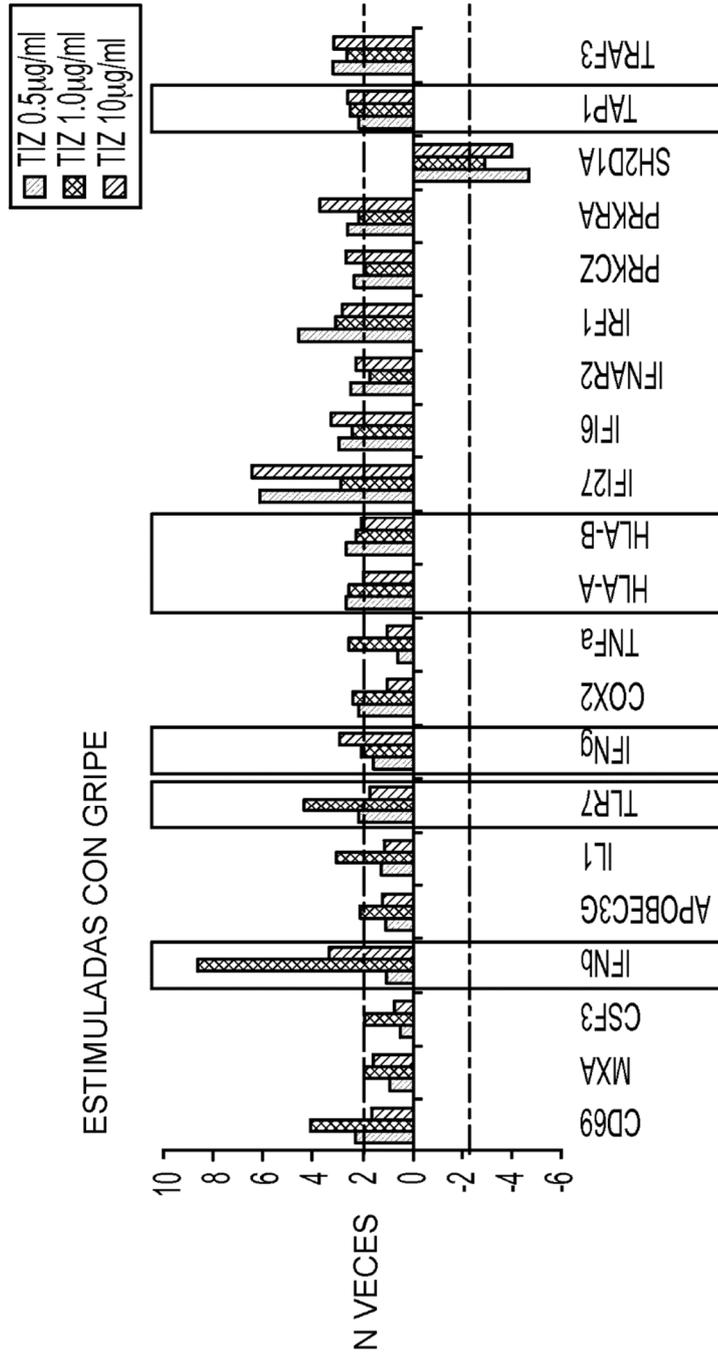


FIG. 3C

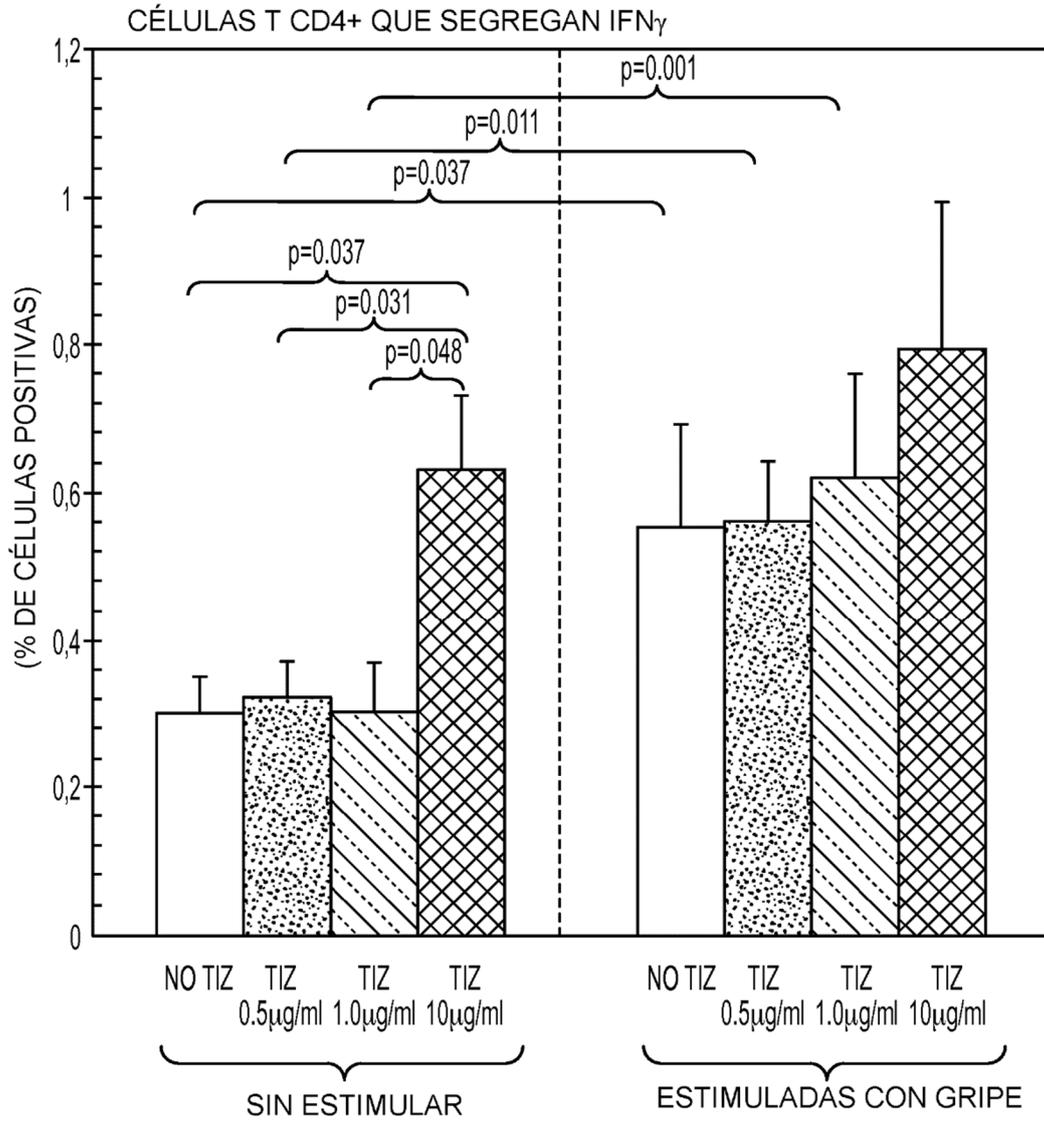


FIG. 4A

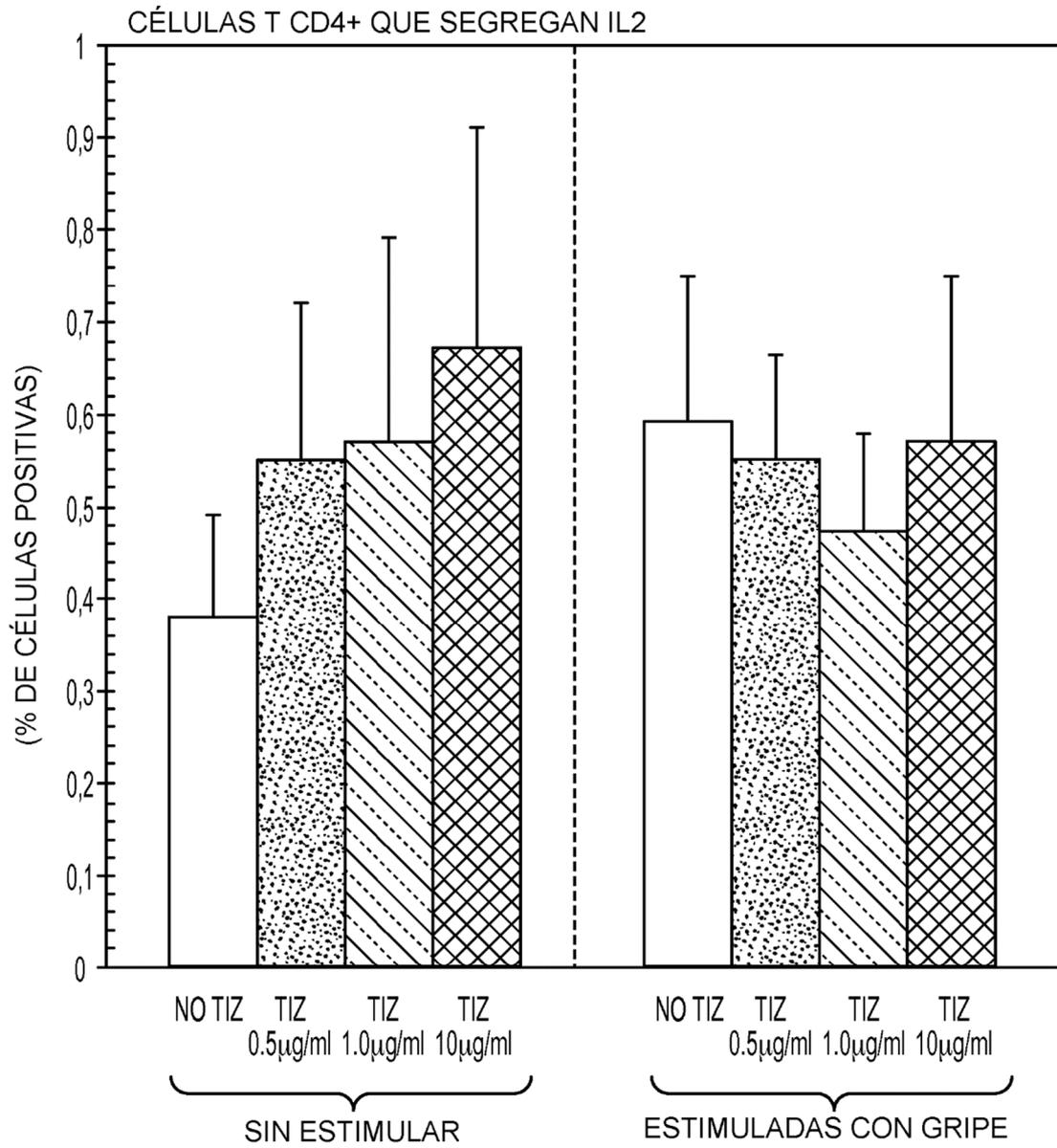


FIG. 4B

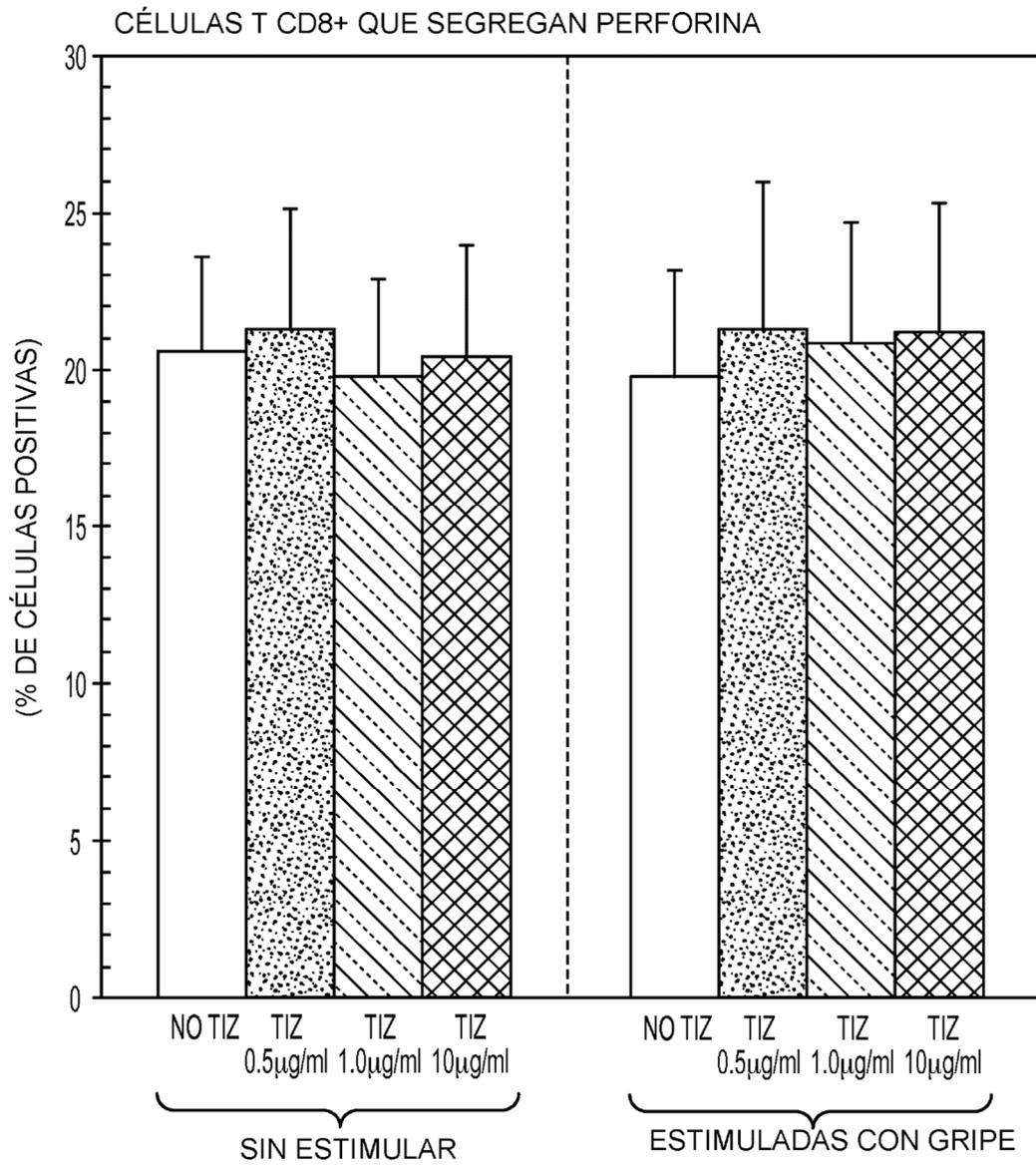


FIG. 5A

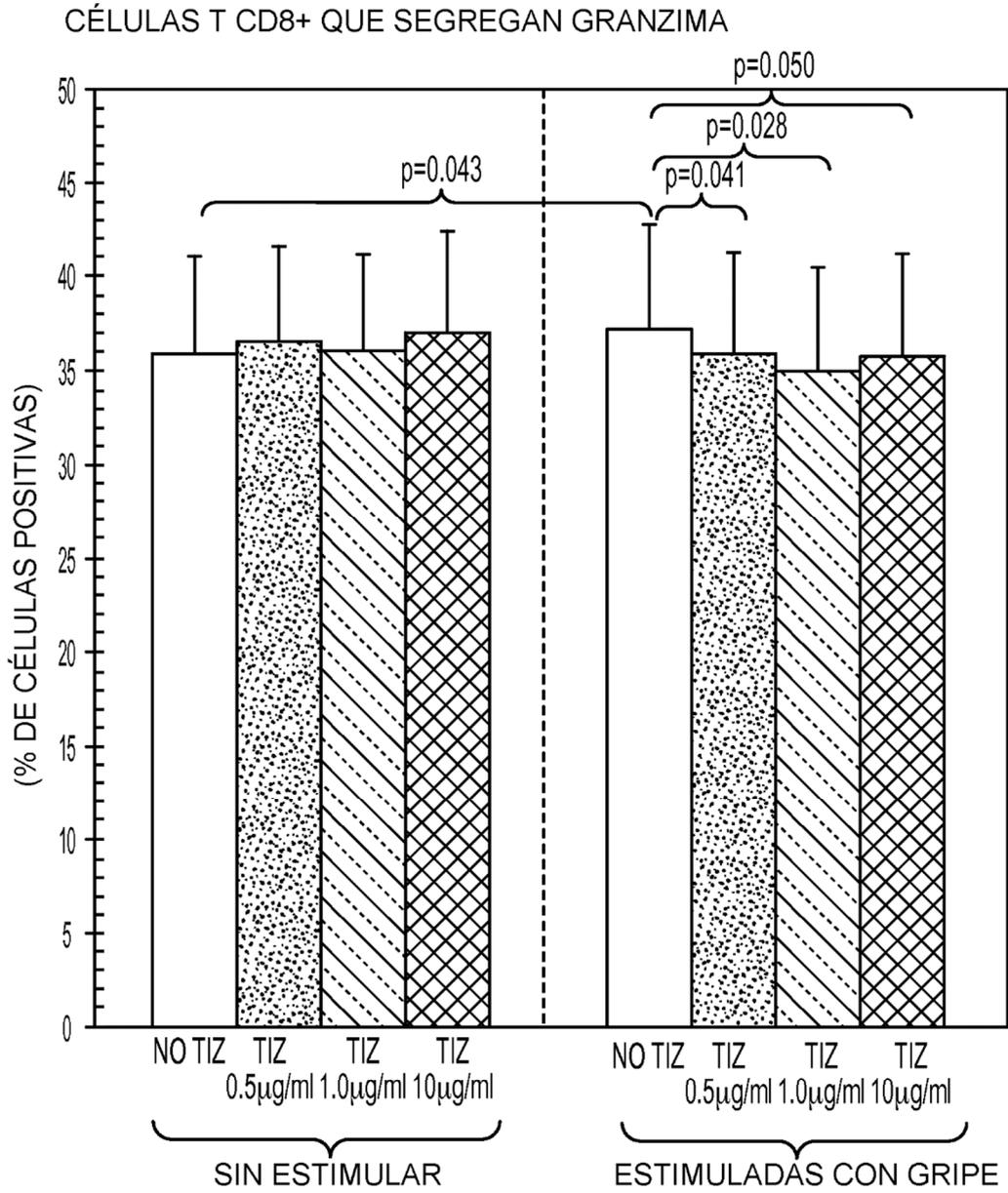


FIG. 5B

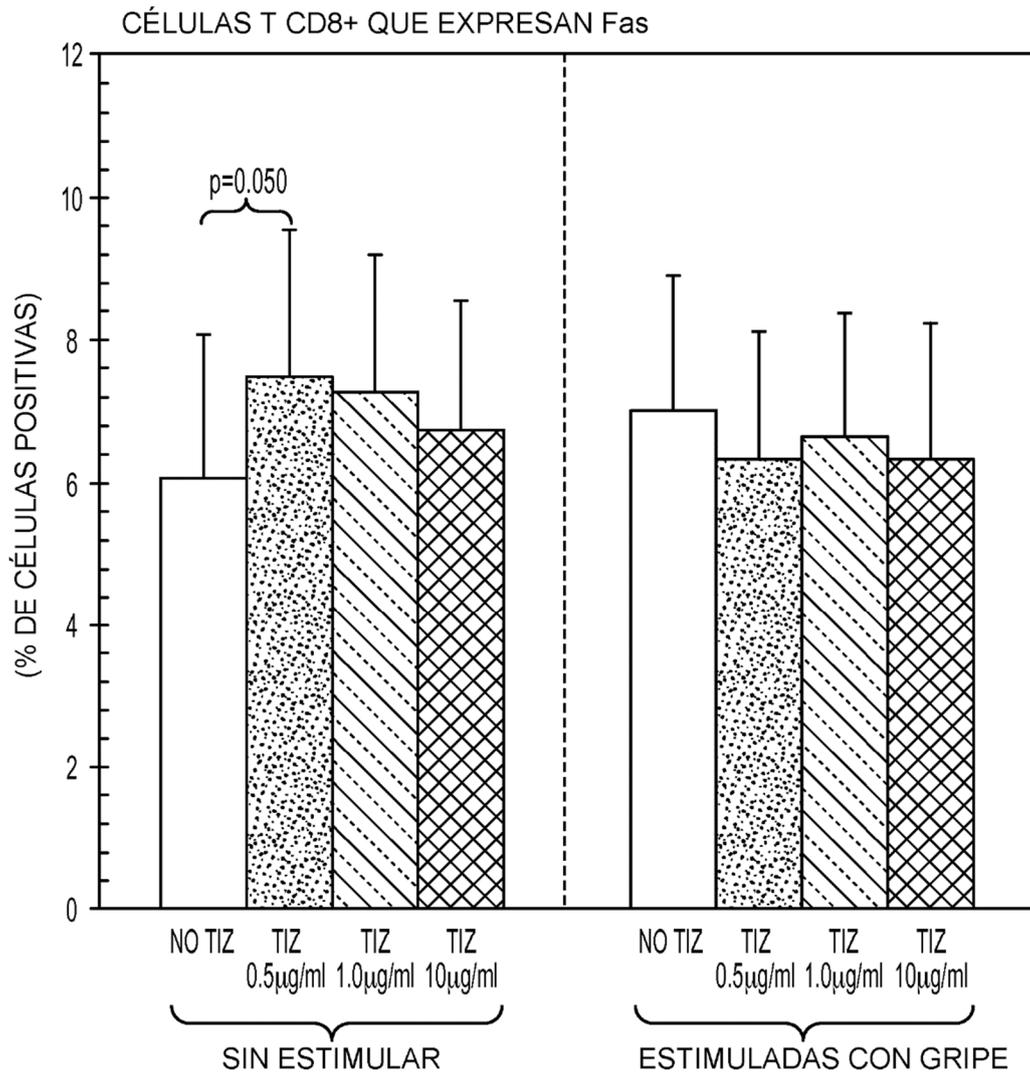


FIG. 5C

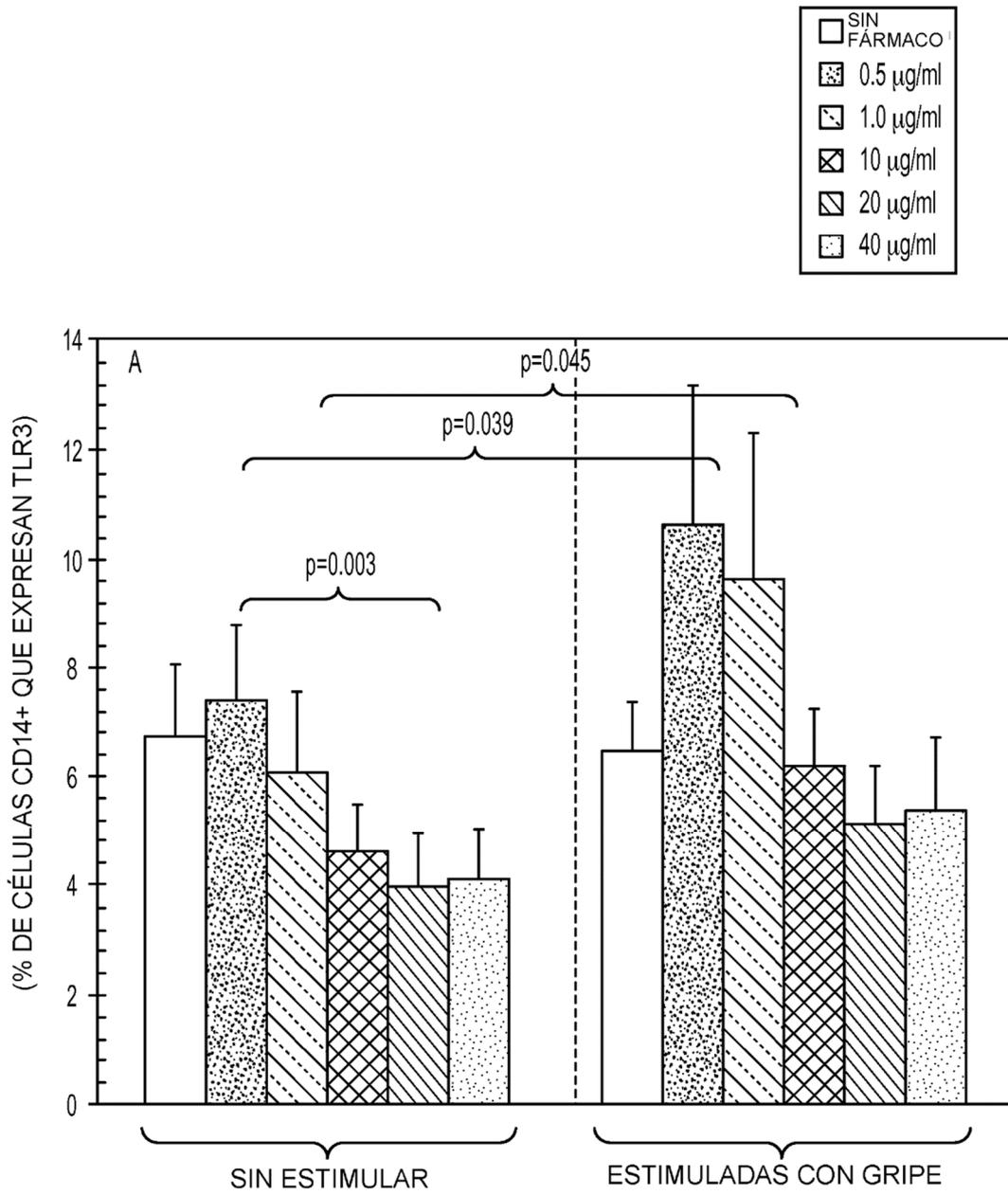


FIG. 6A

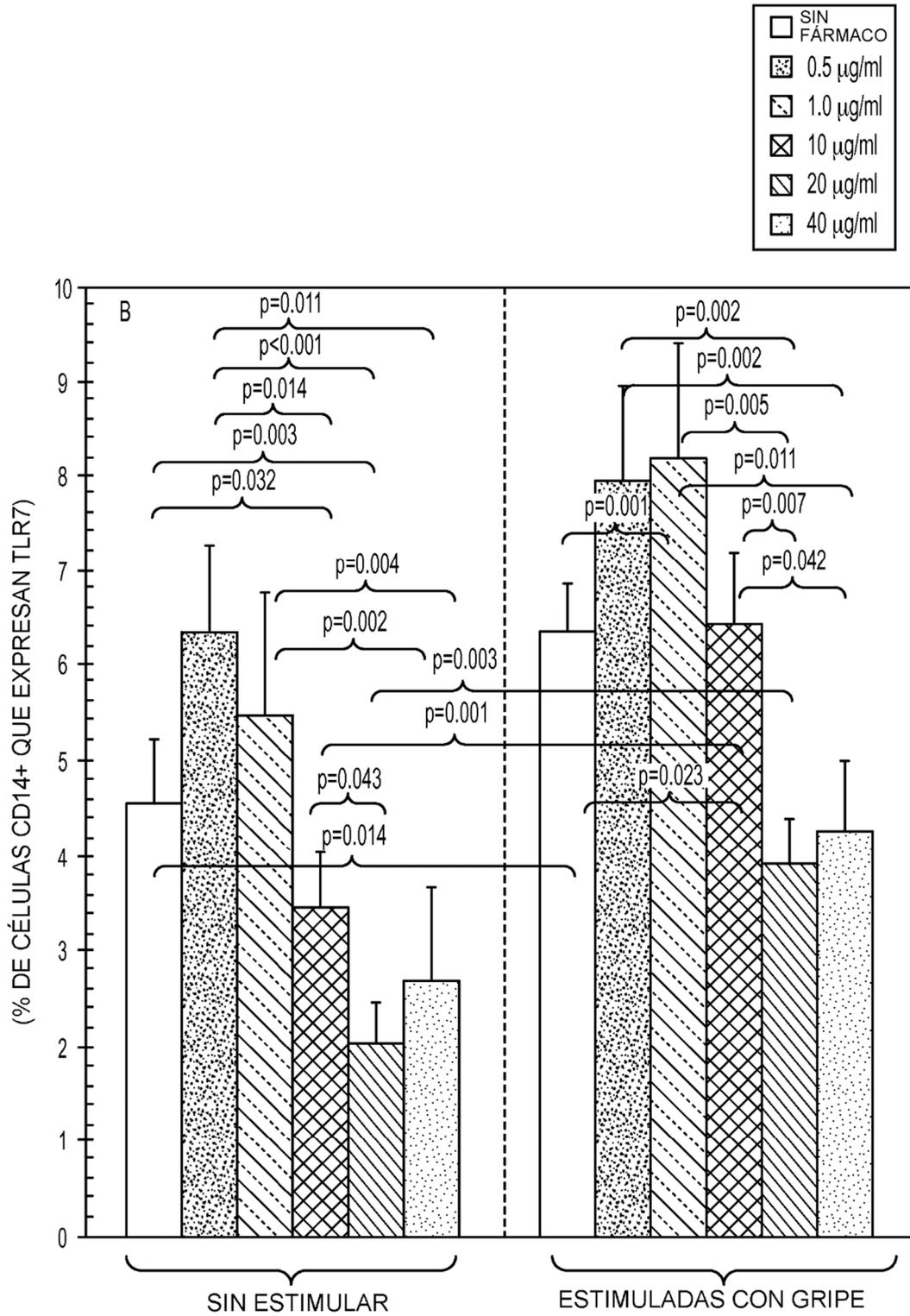


FIG. 6B

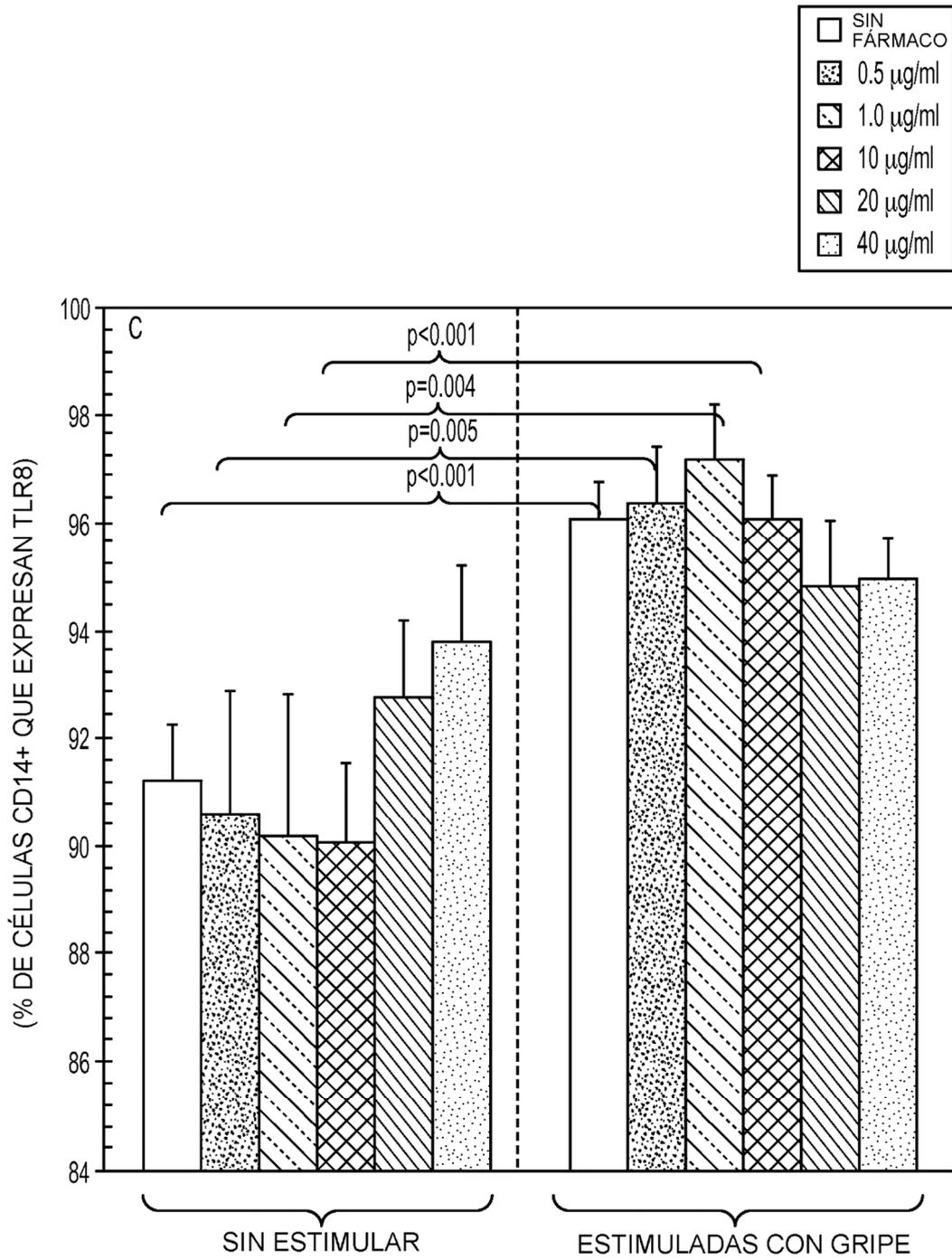


FIG. 6C

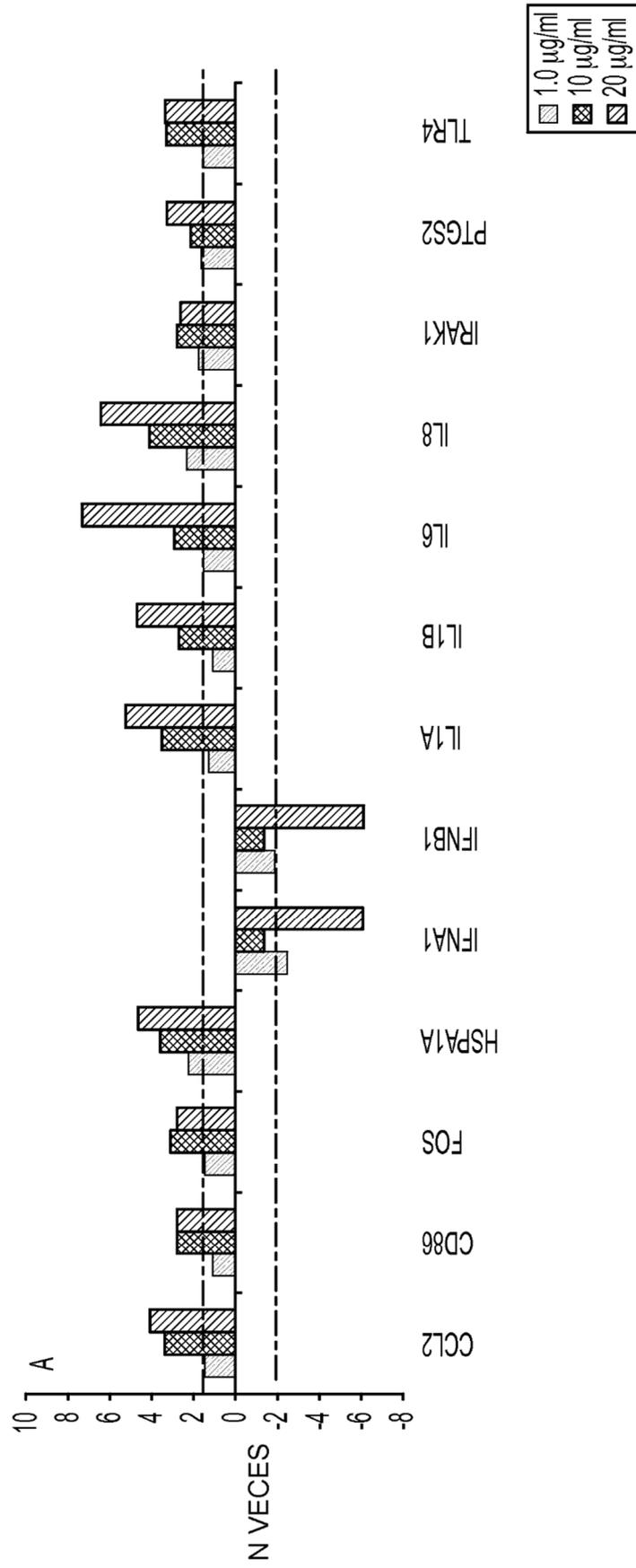


FIG. 7A

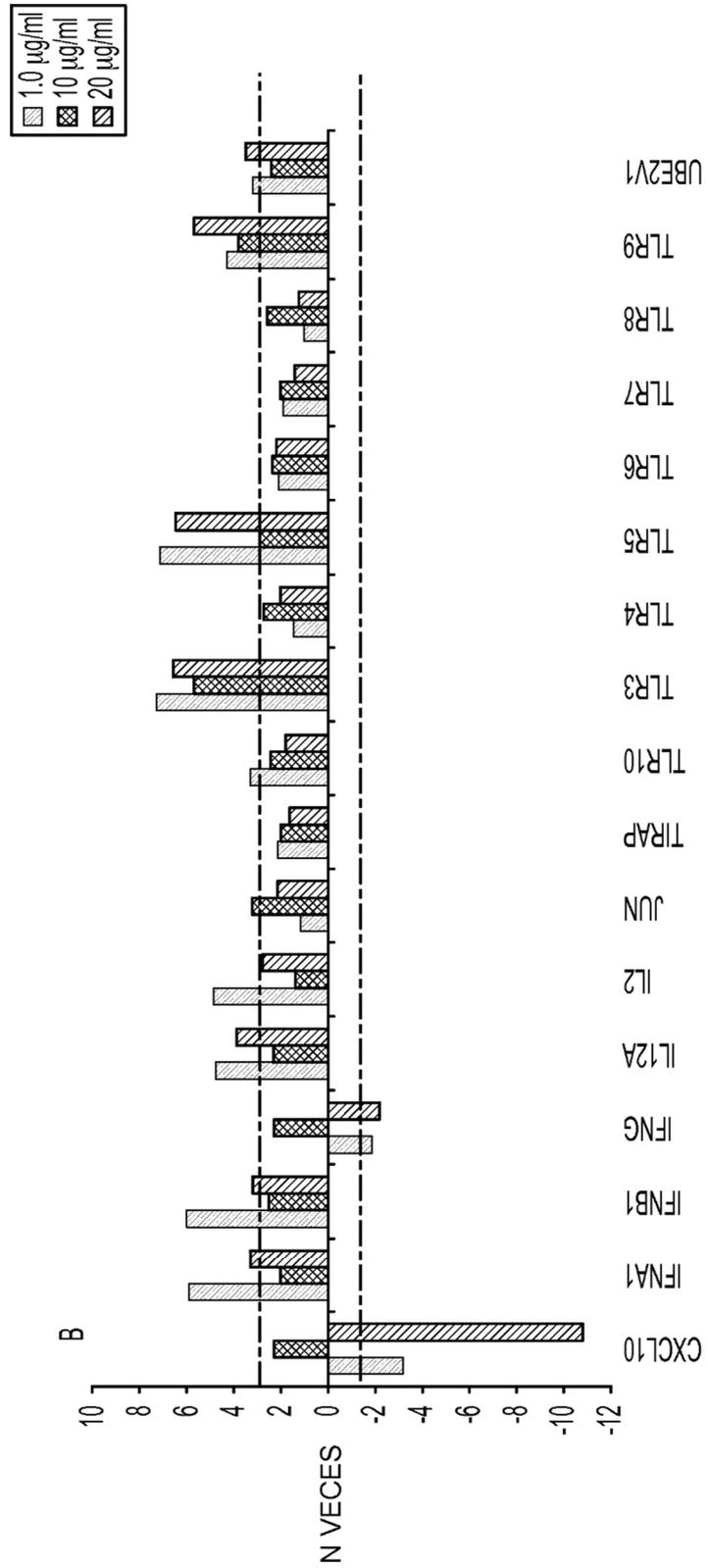


FIG. 7B

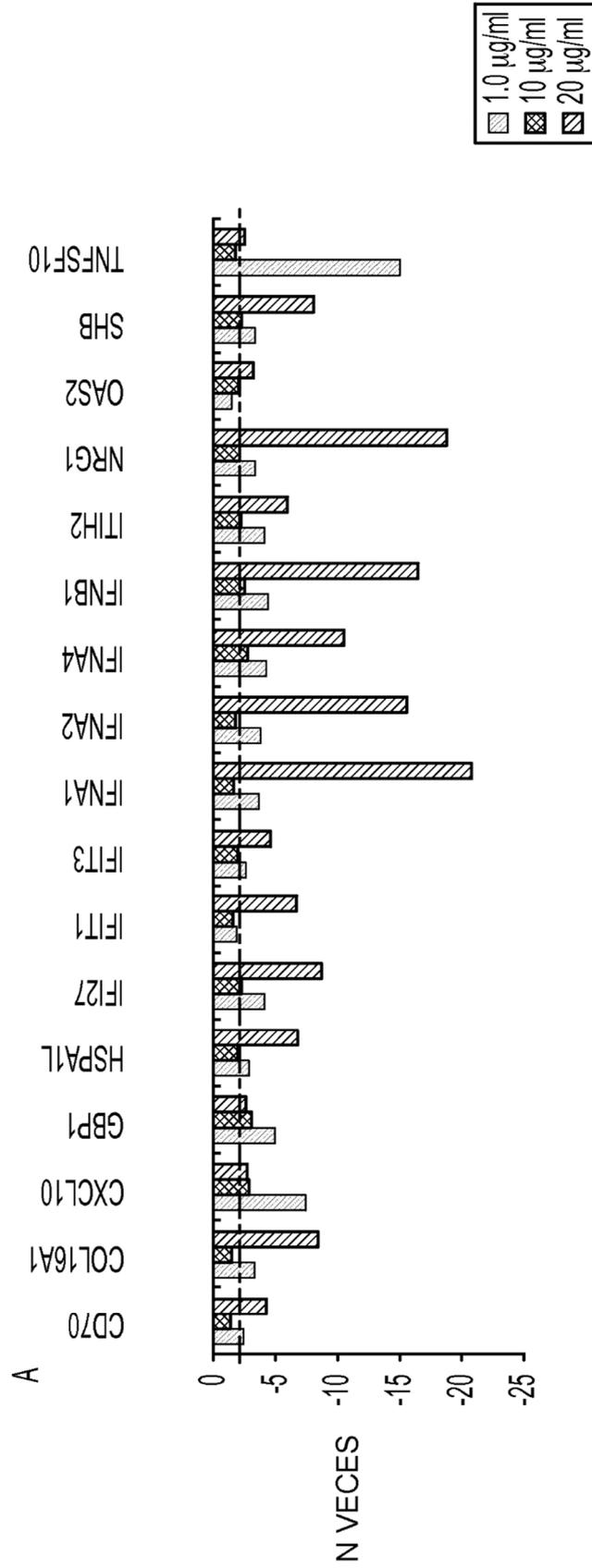


FIG. 8A

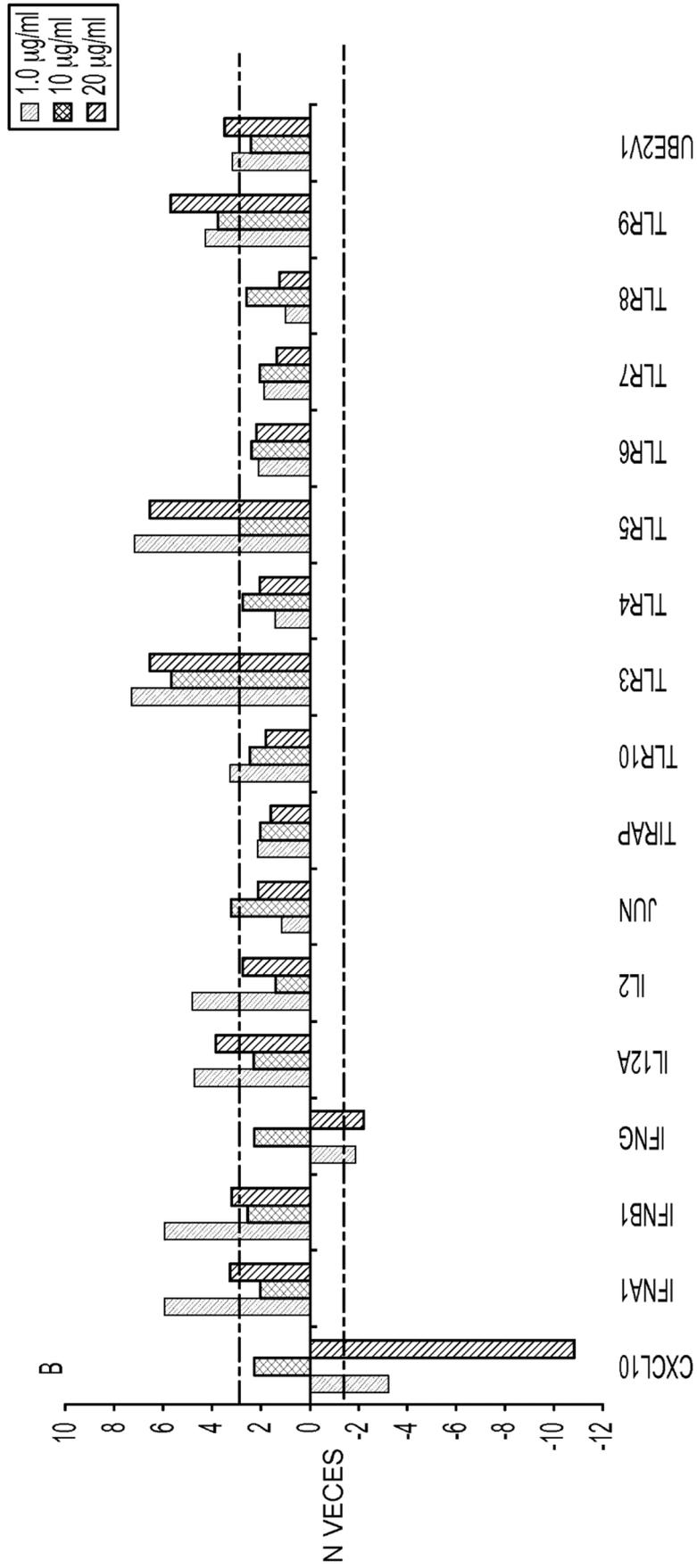


FIG. 8B

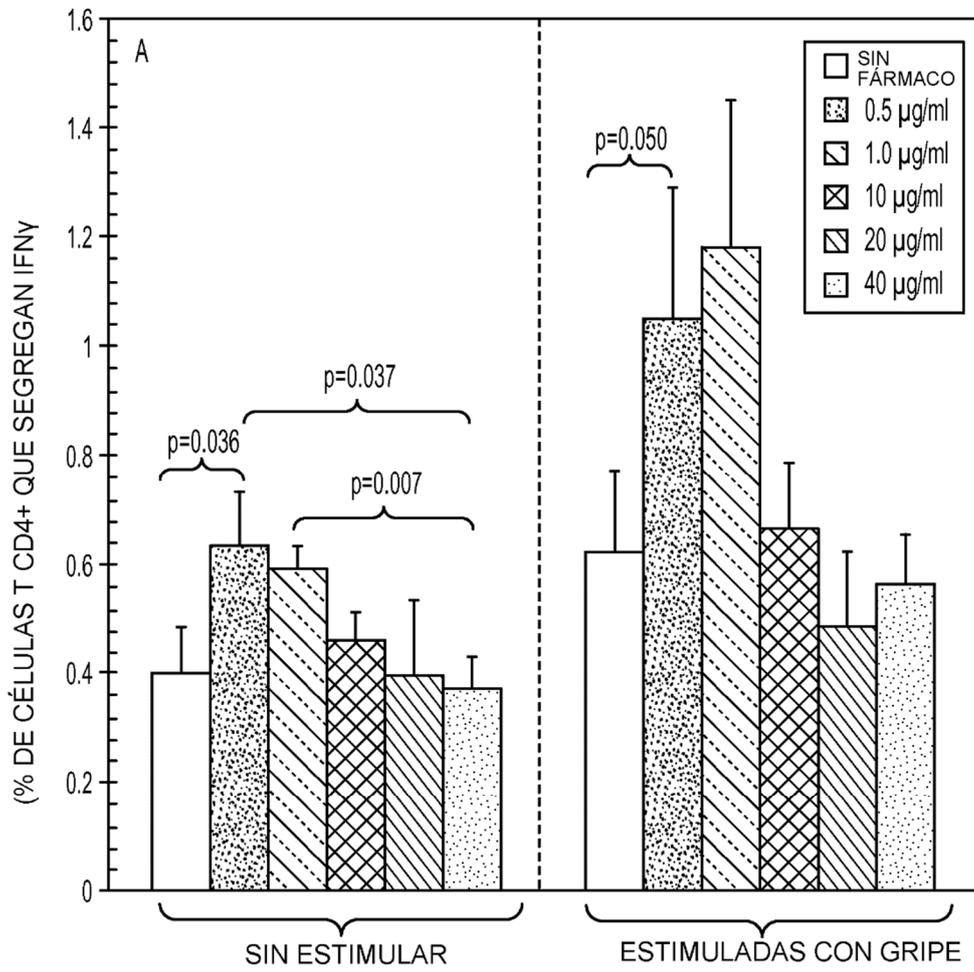


FIG. 9A

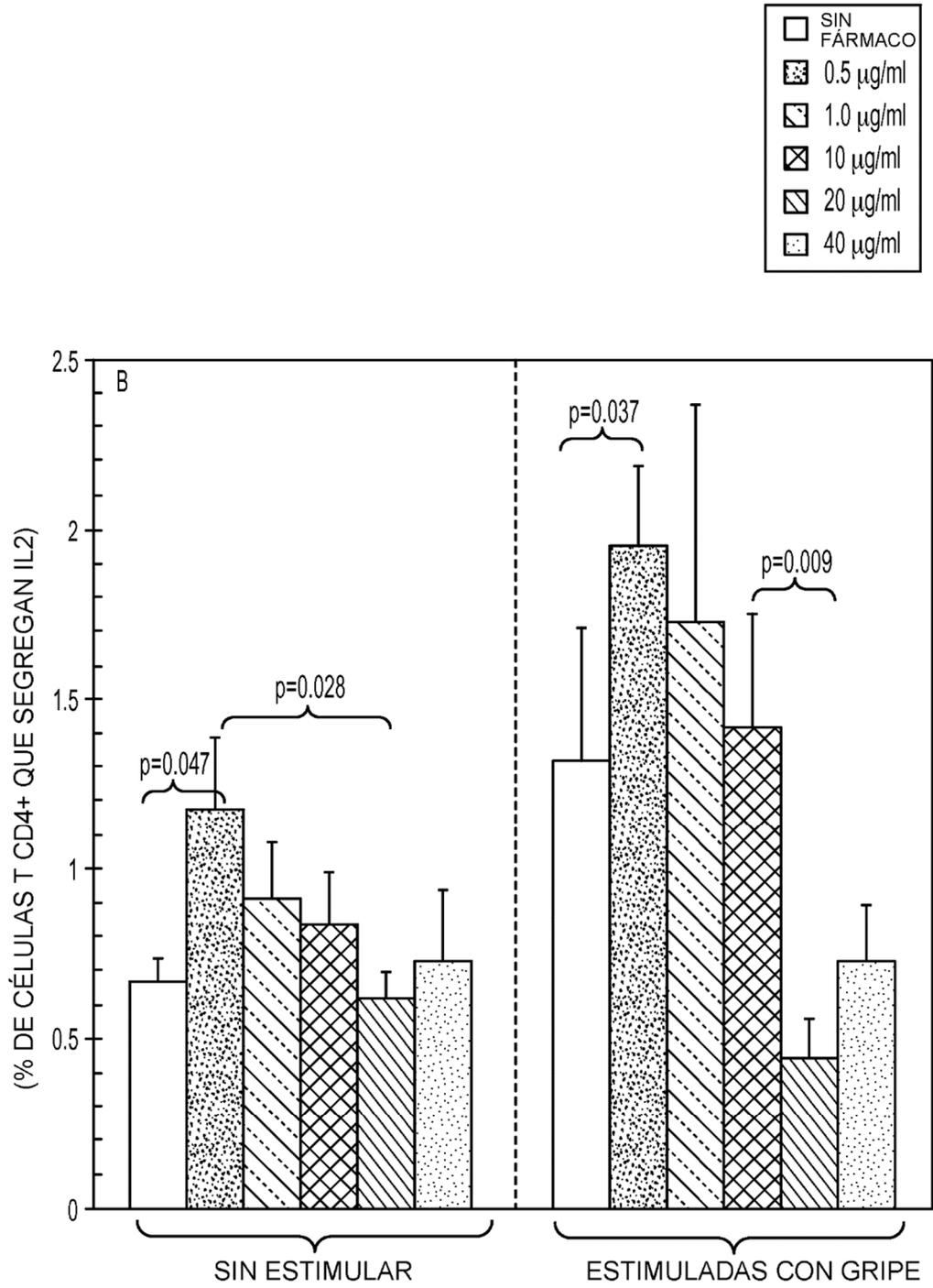


FIG. 9B

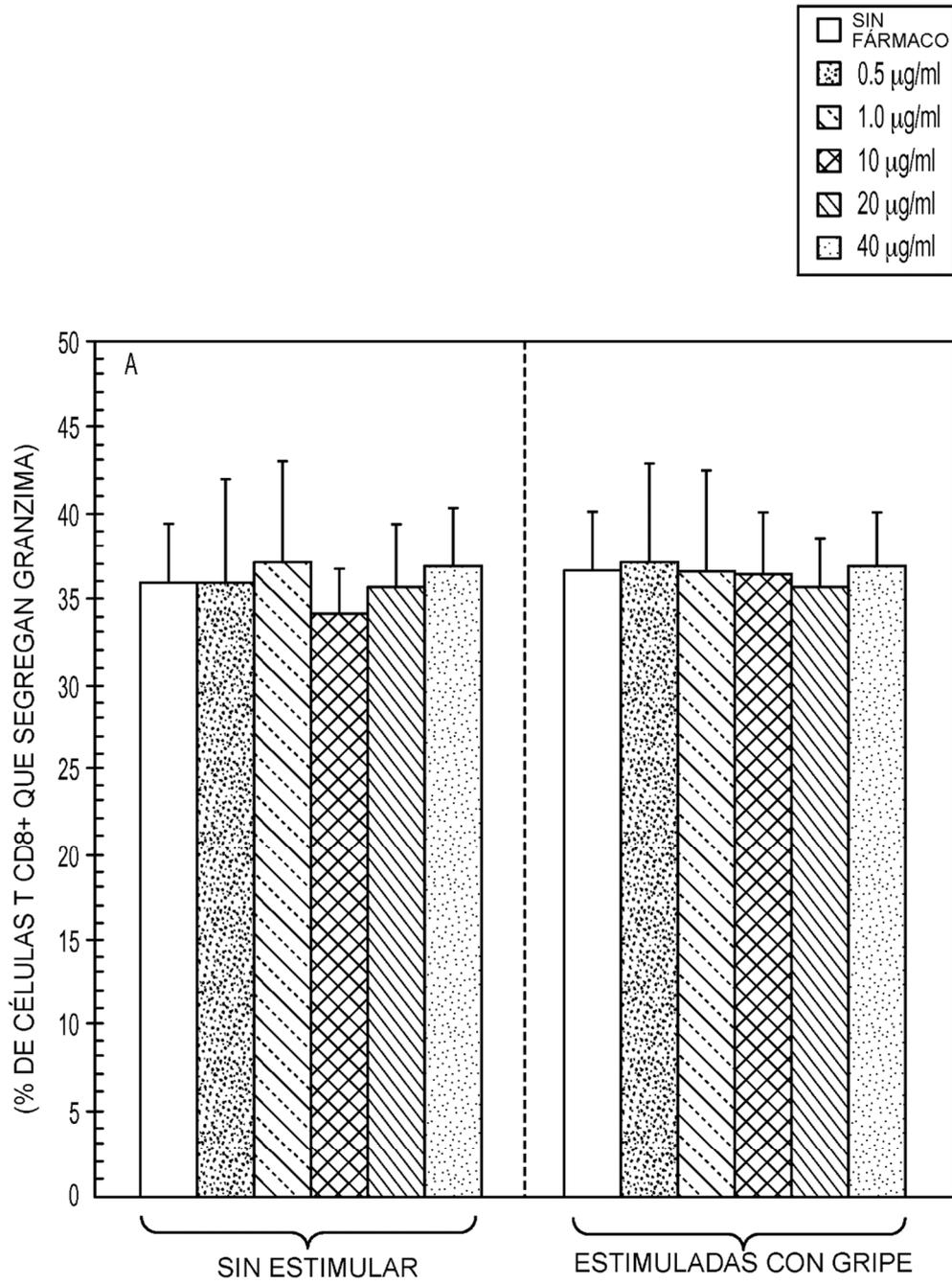


FIG. 10A

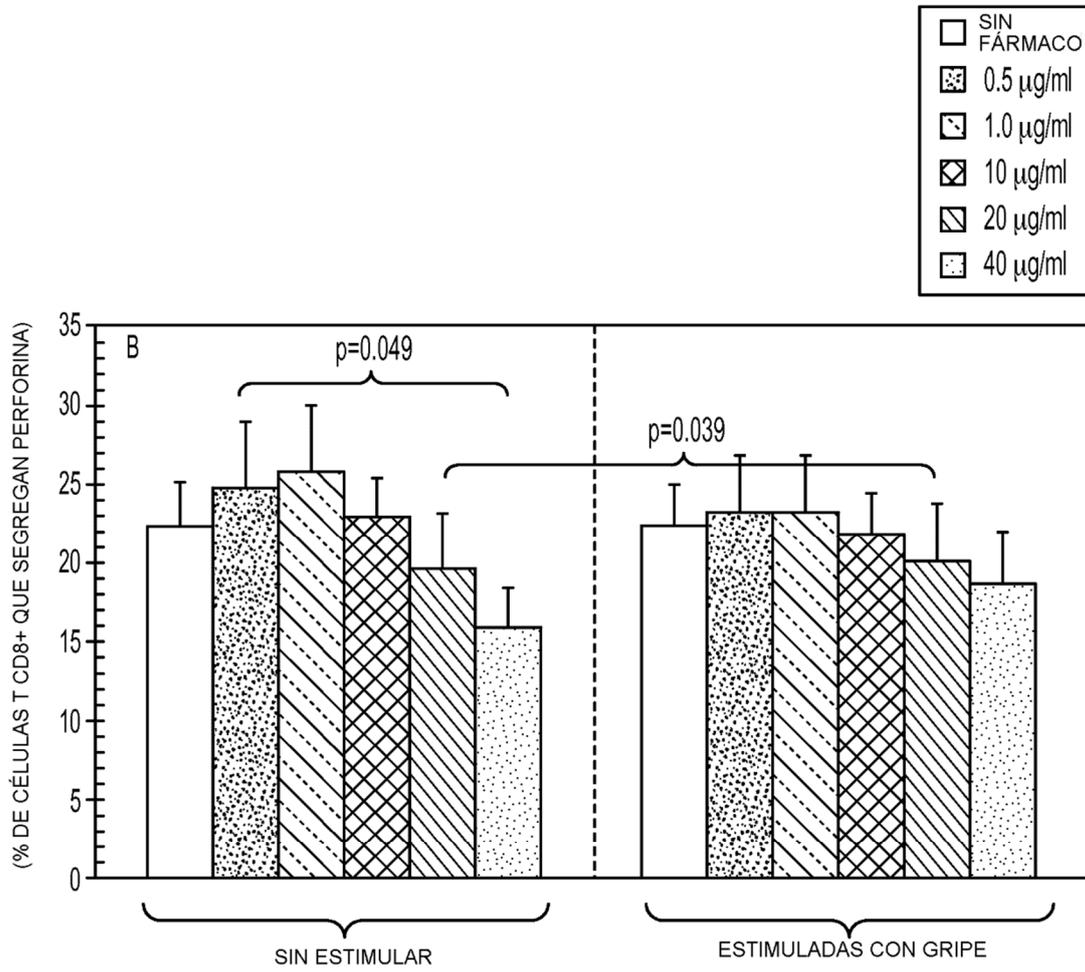


FIG. 10B

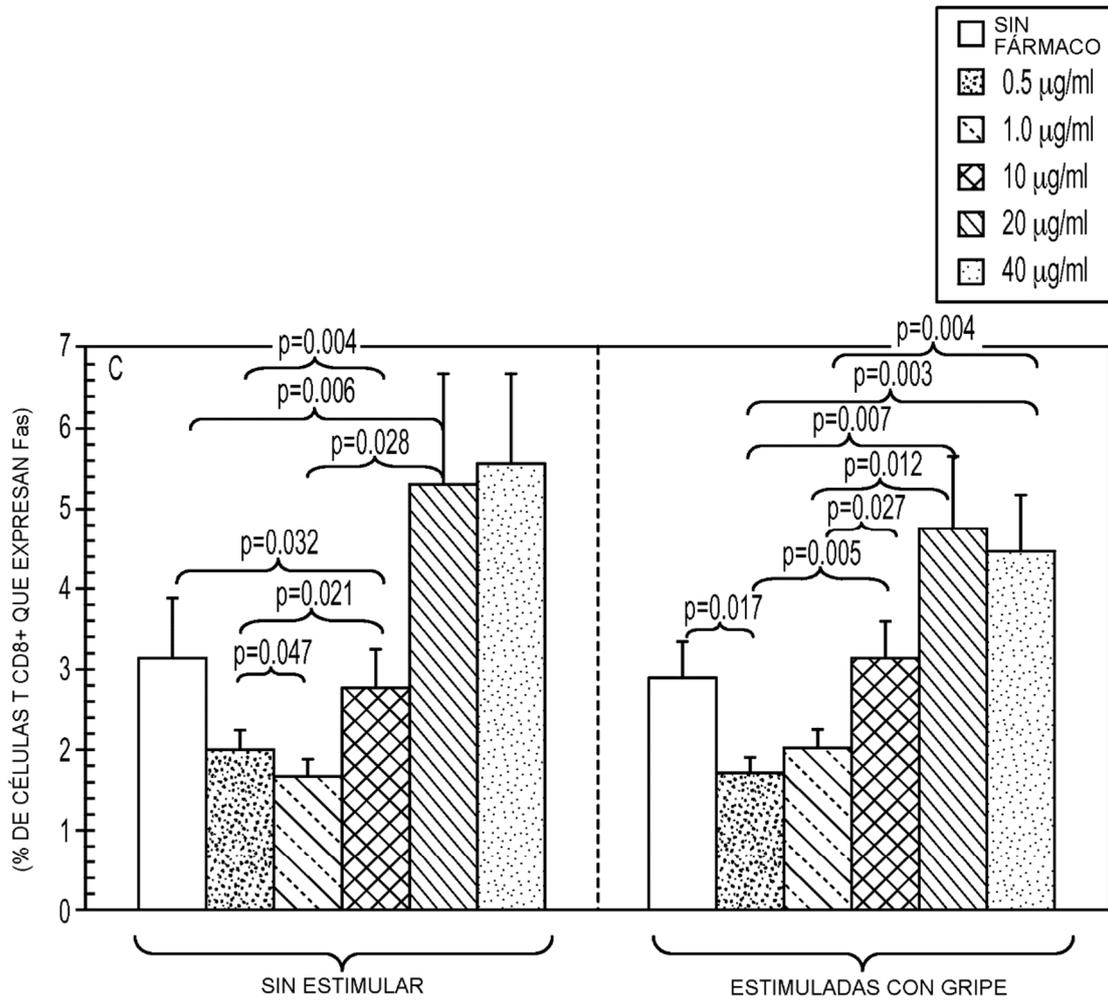


FIG. 10C

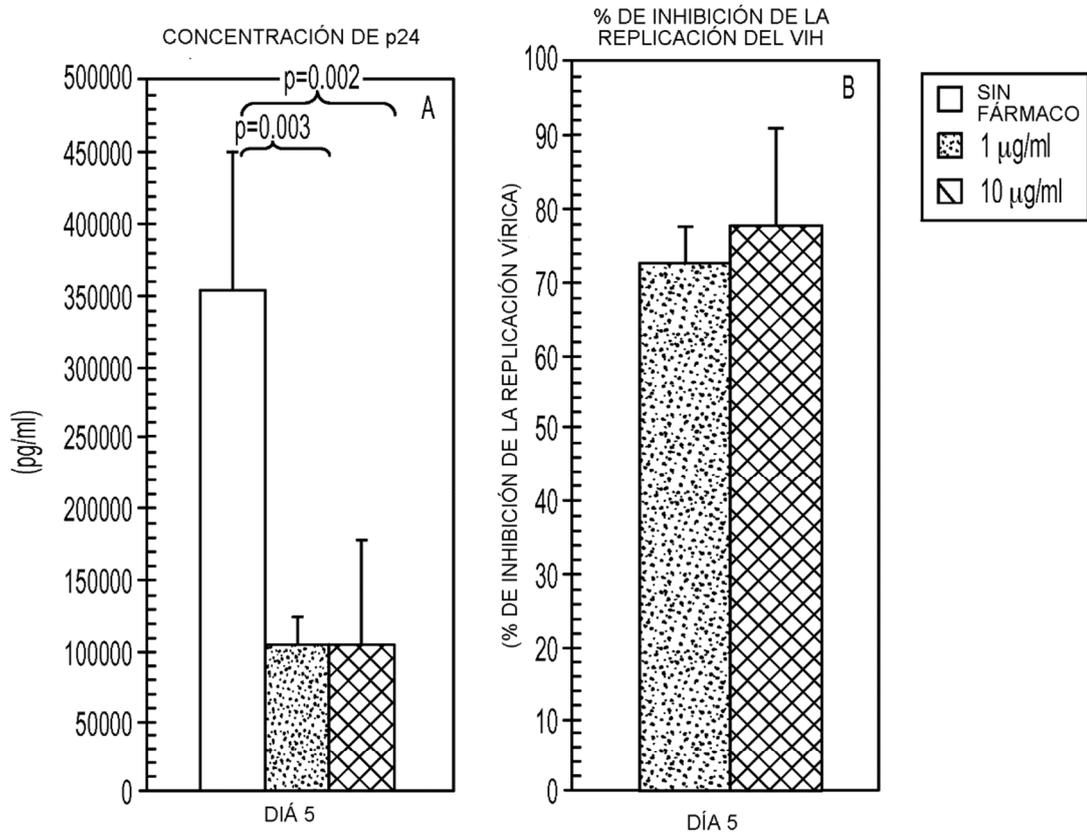


FIG. 11A

FIG. 11B