

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036505**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.11.18**(21) Номер заявки  
**201891975**(22) Дата подачи заявки  
**2017.03.30**(51) Int. Cl. **A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 31/426** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ИЛИ СОСТОЯНИЯ, ВЫЗВАННОГО ВИРУСОМ, ПРИНАДЛЕЖАЩИМ К РОДУ ENTEROVIRUS**(31) **62/316,463**(32) **2016.03.31**(33) **US**(43) **2019.03.29**(86) **PCT/US2017/024976**(87) **WO 2017/173056 2017.10.05**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РОМАРК ЛАБОРАТОРИЗ Л.С. (US)**(72) Изобретатель:  
**Росиньоль Жан-Франсуа, Санторо  
Мария Габриэлла (US)**(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**(56) S. Piacentini ET AL.: "Società Italiana Di Microbiologia-43rd National Congress of the Italian Society of Microbiology", 27 September 2015 (2015-09-27), XP055370452, Retrieved from the Internet: URL: [http://www.societasim.it/documenti/sim\\_2015-atti.pdf](http://www.societasim.it/documenti/sim_2015-atti.pdf) [retrieved on 2017-05-09] See poster abstract P012 on page 66"Influenza and Other Respiratory Virus Infections: Advances in Clinical Management", 6 June 2014 (2014-06-06), XP055370352, Retrieved from the Internet: URL: [https://isirv.org/site/images/stories/avg/documents/intranet/Tokyo/programe\\_abst\\_ract\\_book.pdf](https://isirv.org/site/images/stories/avg/documents/intranet/Tokyo/programe_abst_ract_book.pdf) [retrieved on 2017-05-08] See Poster Abstract P54 on page 81

SANTORO ET AL.: "Thiazolidines: A New Class of Broad-Spectrum Antiviral Drugs Targeting Virus Maturation", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 74, no. 3, 27 March 2007 (2007-03-27), page A31, XP022002046, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2007.01.019 the whole document

ROSSIGNOL JEAN-FRANÇOIS E.D. - BILLIAU A. ET AL.: "Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER BV, NL, vol. 110, 7 August 2014 (2014-08-07), pages 94-103, XP029061607, ISSN: 0166-3542, DOI: 10.1016/J.ANTIVIRAL.2014.07.014 See Section 3.1.2. Mechanism of action; page 96, column 2, paragraphs 2, 4; table 1  
US-A1-2010330173

FREDERIC VIGANT ET AL.: "Broad-spectrum antivirals against viral fusion", NATURE REVIEWS. MICROBIOLOGY, vol. 13, no. 7, 15 June 2015 (2015-06-15), pages 426-437, XP055369859, GB ISSN: 1740-1526, DOI: 10.1038/nrmicro3475 page 427, column 1, paragraph 2 - page 427, column 2, paragraph 1; table 1

BENHUR LEE ET AL.: "Modes of paramyxovirus fusion: a Henipavirus perspective", TRENDS IN MICROBIOLOGY, vol. 19, no. 8, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 389-399, XP055370465, GB ISSN: 0966-842X, DOI: 10.1016/j.tim.2011.03.005 abstract

SCHEID A. ET AL.: "Role of paramyxovirus glycoproteins in the interactions between viral and cell membranes", SOCIETY OF GENERAL PHYSIOLOGISTS SERIES 1980, vol. 34, 1980, pages 119-130, XP9194313, ISSN: 0094-7733 page 43, column 2, paragraph 2

S. Piacentini ET AL.: "44° CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI MICROBIOLOGIA", 25 September 2016 (2016-09-25), pages 1-184, XP055370447, Retrieved from the Internet: URL: [http://www.societasim.it/documenti/sim\\_2016-abstract-book.pdf](http://www.societasim.it/documenti/sim_2016-abstract-book.pdf) [retrieved on 2017-05-09] See poster abstract P094 on page 123

ERIC RHODEN ET AL.: "In Vitro Efficacy of Antiviral Compounds against Enterovirus D68: TABLE 1", ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 59, no. 12, 14 September 2015 (2015-09-14), pages 7779-7781, XP55370158, ISSN: 0066-4804, DOI: 10.1128/AAC.00766-15 page 7779, column 1, lines 39-42; table 1

(57) Изобретение относится к тиазолидным соединениям, более конкретно к их применению для лечения определенных вирусных инфекций, в частности, вызываемых вирусом, принадлежащим к роду Enterovirus. Предложен способ лечения заболевания или состояния, вызванного вирусом, принадлежащим к роду Enterovirus, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из нитазоксанида, тизоксанида или их фармацевтически приемлемой соли.

**036505**  
**B1**

**036505**  
**B1**

### Приоритет

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/316463, поданной 31 марта 2016 г., полное содержание которой включено в настоящее описание.

### Область техники

Настоящая заявка в целом относится к тиазolidным соединениям, более конкретно к их применению для лечения определенных вирусных инфекций, в частности, вызываемых вирусом, принадлежащим к роду Enterovirus.

### Краткое описание изобретения

Предложен способ лечения заболевания или состояния, вызванного вирусом, принадлежащим к роду Enterovirus, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из нитазоксанида, тизоксанида или их фармацевтически приемлемой соли. Указанное эффективное количество может представлять собой количество, которое блокирует созревание гликопротеина F вируса у субъекта.

### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена таблица анализа выживаемости по процедуре Каплана-Мейера для инфицированных респираторно-синцитиальным вирусом (RSV) пациентов, получавших нитазоксанид и плацебо. TTSALL обозначает время до начала ослабления симптомов (в часах). Этот график показывает, что с лечением нитазоксанидом связано 76-часовое снижение продолжительности симптомов (медиана).

На фиг. 2 представлен график выживаемости по процедуре Каплана-Мейера для пациентов, инфицированных вирусом, принадлежащим к роду Enterovirus (включая энтеровирусы и риновирусы), определенных в качестве единственной причины болезни и получавших лечение а) нитазоксанидом; б) нитазоксанидом и осельтамивиром; в) осельтамивиром и д) плацебо.

На фиг. 3 представлен график выживаемости по процедуре Каплана-Мейера для пациентов, инфицированных вирусом, принадлежащим к роду Enterovirus (включая энтеровирусы и риновирусы), определенных в качестве единственной причины болезни, после лечения а) отдельно нитазоксанидом или комбинацией нитазоксанида и осельтамивира и б) отдельно осельтамивиром или плацебо.

Фиг. 4А-В иллюстрирует противовирусную активность нитазоксанида в инфицированных вирусом Сендай клетках AGMK. В частности, на фиг. 4А представлен график, показывающий ингибирование вируса Сендай в зависимости от концентрации нитазоксанида. На фиг. 4В представлены фотографии контроля необработанного вируса Сендай и вируса Сендай, обработанного нитазоксанидом.

На фиг. 5 представлены графики ингибирования для вируса Сендай (SeV) в зависимости от концентрации нитазоксанида для различных кратностей инфекции и различных типов клеток. Данные на фиг. 5 показывают, что противовирусная активность нитазоксанида в SeV-инфицированных клетках не зависит от множественности заражения и типа клеток.

На фиг. 6 представлены данные SDS-PAGE, демонстрирующие воздействие нитазоксанида на синтез белка SeV.

На фиг. 7 представлены данные SDS-PAGE и вестерн-блоттинга, демонстрирующие воздействие нитазоксанида на синтез белка SeV-F.

На фиг. 8 представлены данные вестерн-блоттинга, демонстрирующие обнаружение незрелой формы белка SeV-F в нерастворимой фракции белковых экстрактов AGMK, обработанных нитазоксанидом (NTZ).

На фиг. 9 представлены данные вестерн-блоттинга, демонстрирующие обнаружение незрелой формы белка SeV-F в нерастворимой фракции белковых экстрактов AGMK, обработанных нитазоксанидом (NTZ).

На фиг. 10 представлены фотографии, которые свидетельствуют о том, что нитазоксанид ингибирует перенос гликопротеина вируса Хендра (HeV) F на поверхность клетки.

Фиг. 11А-С иллюстрируют ингибирование вируса парагриппа SeV нитазоксанидом в клетках AGMK. А, В. NTZ ингибирует репликацию SeV в условиях одностадийного (А) и многостадийного (В) роста вируса. Клетки почки обезьяны AGMK, инфицированные SeV, обрабатывали различными концентрациями NTZ или носителем сразу после периода адсорбции вируса. Выход вируса ( $\odot$ ) определяли через 24 ч (А) или 48 ч (В) после инфицирования (p.i.) при помощи титрования гемагглютинином (правые панели) и анализа бляшкообразования (левые панели). Выход вируса, выраженный в единицах ГА (ГАЕ)/мл или БОЕ/мл, представляет собой среднее  $\pm$  СО из четырех параллельных образцов. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ . Жизнеспособность контрольных ложноинфицированных клеток ( $\Delta$ ) определяли МТТ-тестом. (С) Цитопротекторный эффект NTZ (10 мкг/мл) в SeV-инфицированных клетках AGMK через 24 ч p.i.

NTZ эффективен в ингибировании репликации SeV в концентрациях, которые были не токсичными для клеток-хозяев. NTZ фактически оказывал цитопротекторное действие в инфицированных клетках. Фактически инфицирование SeV (3 БОЕ/клетка) в целом характеризуется обширным цитопатическим эффектом, вызывая изменение формы и размера клеток и потерю адгезии (панель С, SeV). Было также обнаружено, что обработка NTZ (10 мкг/мл) в дополнение к ингибированию продуцирования вирусного потомства защищает клетки AGMK от повреждения, вызываемого вирусом (панель С, SeV+NTZ). Дан-

ные, представленные на фиг. 11А-С, схожи с данными, представленными на фиг. 4А-В.

На фиг. 12 представлены данные, демонстрирующие ингибирование вируса парагриппа SeV нитазоксанидом в альвеолярных клетках человека A549. Альвеолярные тип II-подобные клетки человека A549, инфицированные SeV в одностадийных (3 БОЕ/клетка) и многостадийных (0,01 БОЕ/клетка) условиях роста вируса, обрабатывали различными концентрациями NTZ или носителя сразу после периода адсорбции вируса. Выход вируса ( $\odot$ ) определяли через 24 ч (для одностадийных условий) или 48 ч (для многостадийных условий) р.і. титрованием ГА. Выход вируса, выраженный в процентах от необработанного контроля, представляет среднее $\pm$ СО из четырех параллельных образцов. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ .

Противовирусная активность NTZ не зависела от типа клетки. NTZ фактически также эффективен в альвеолярных тип-II-подобных клетках человека A549, инфицированных SeV. Данные, представленные на фиг. 12, схожи с данными, представленными на фиг. 5.

На фиг. 13 А-В показано влияние нитазоксанида на синтез белка SeV.

(А) Авторадиография [ $^{35}$ S]Met/Cys-меченых белков (длительный импульс, 18 ч, начало через 6 ч р.і.) из ложноинфицированных (Mock) или SeV-инфицированных (SeV) клеток AGMK, обработанных 10 мкг/мл NTZ, 2,5 мкг/мл туникамицина (ТМ) или носителем (С) после адсорбции вируса. Вирусные белки обозначены. (В) Авторадиография [ $^{35}$ S]Met/Cys-меченых белков (короткий импульс, 1 ч) через 24 ч р.і. из ложноинфицированных или SeV-инфицированных клеток, обработанных, как в (А). Образцы с одинаковой радиоактивностью (правая панель, импульсов в минуту) или содержащие равное количество белков (левая панель, мл) обрабатывали SDS-PAGE и авторадиографией.

Было обнаружено, что основные белки SeV синтезируются в больших количествах в необработанных клетках через 24 ч р.і. как после длинных (А, 18 ч), так и после коротких (В, 1 ч) пульсов [ $^{35}$ S]Met/Cys-мечения; в обработанных NTZ клетках не было обнаружено существенных изменений в синтезе белка SeV, за исключением исчезновения полосы молекулярной массы примерно 65-70 кДа, впоследствии идентифицированной как зрелая изоформа предшественника белка слияния Fo (см. фиг. 14). Данные, представленные на фиг. 13А-В, схожи с данными, представленными на фиг. 7.

На фиг. 14А-В показано влияние нитазоксанида на белок слияния SeV.

(А) Уровни белка SeV-F были определены с помощью вестерн-блоттинга с использованием моноклонального антитела SeV-F в разное время р.і. в инфицированных SeV клетках AGMK, обработанных 10 мкг/мл NTZ, 2,5 мкг/мл туникамицина (ТМ) или носителем (С). Показан также ложноинфицированный контроль (Mock). Уровни  $\alpha$ -тубулина в тех же образцах показаны как контроль нагрузки. (В) Радиоавтография [ $^{35}$ S]Met/Cys-меченых белков (длительный импульс, 1 ч, начало в разное время р.і.) из ложноинфицированных (Mock) или SeV-инфицированных клеток AGMK, обработанных 10 мкг/мл NTZ или носителем (С) после адсорбции вируса. Обозначены вирусные белки NP и F.

Результаты подтверждают отсутствие белка слияния SeV в клетках, обработанных NTZ. Аналогичные результаты были получены в клетках, обработанных ТМ. Данные, представленные на фиг. 14А-В, схожи с данными, представленными на фиг. 8.

На фиг. 15А-В показано, что нитазоксанид вызывает нерастворимость белка SeV-F.

Вестерн-блоттинг для SeV-F и  $\beta$ -актина в ложноинфицированных или SeV-инфицированных клетках AGMK, обработанных 10 мкг/мл NTZ, 2,5 мкг/мл туникамицина (ТМ) или носителем (С) в присутствии (+) или отсутствии (-) ингибитора протеасомы бортезомиба (bortezomib) (Btz, 25 нМ) или ингибитора аутофагии хлорохина (CQ, 20 или 40 мкМ). (А) Показаны растворимые фракции клеточных лизатов, экстрагированные буфером-В ("растворимые"), или суммарные лизаты клеток из параллельных образцов, извлеченных буфером Лэммли для образцов ("общие"). (В) Иммуноблот проводили для SeV-F и  $\beta$ -актина из растворимых и нерастворимых фракций экстрактов из целых клеток, полученных при экстракции буфером-В из клеток AGMK, обработанных, как указано. Нерастворимые фракции обрабатывали, как описано в разделе "Материалы и методы". Символами "Fr" обозначена более быстромигрирующая F-форма в обработанных NTZ клетках.

Ингибитор протеасом бортезомиб или ингибитор аутофагии хлорохин не предотвращали снижение уровня F-белка в обработанных клетках, что указывает на эффект, не зависящий от деградации, опосредованной протеасомой или аутофагией; вместо этого F-белок был обнаружен в нерастворимом состоянии в обработанных NTZ клетках, что указывает на то, что изменение в процессинге/созревании белка может привести к образованию агрегатов F-белка, присутствующих в нерастворимом состоянии. Данные, представленные на фиг. 15А-В, схожи с данными, представленными на фиг. 9.

На фиг. 16 представлены данные о наличии больших белковых агрегатов SeV-F в клетках, обработанных нитазоксанидом.

Иммуноконфокальная микроскопия ложноинфицированных (Mock) и SeV-инфицированных клеток AGMK, обработанных NTZ (10 мкг/мл) или носителем в течение 24 ч, помеченный антикальнексином (CNX, зеленые) и анти-SeV-F (красные) антителами. Ядра окрашены DAPI (синий). Изображения были получены при помощи системы конфокального лазерного сканирования Olympus Fluoview FV-1000. Отображается наложение трех флуорохромов (обозначено как "MERGE") и увеличенные изображения (риска 7 мкм).

Исследования, проведенные при помощи иммуноконфокальной микроскопии, подтверждают наличие крупных агрегатов F-белка в ER из клеток, обработанных NTZ. На фиг. 17 показано, что нитазоксанид ингибирует перенос гликопротеина SeV-F к поверхности клетки.

Уровни SeV-F гликопротеинов плазматической мембраны (красные) определяли через 24 ч с помощью конфокальной иммунофлуоресцентной микроскопии в SeV-инфицированных клетках AGMK, обработанных 10 мкг/мл NTZ или носителем (SeV). Ложноинфицированные (Mock) клетки приведены как контрольные. Ядра окрашены Хехстом (синие). Изображения были получены при помощи системы конфокального лазерного сканирования Olympus Fluoview FV-1000. Показано наложение двух флуорохромов (риска=10 мкм).

Присутствие F-белка на поверхности клеток-хозяев, обработанных NTZ, не обнаружено, что подтверждает то, что изменение в процессинге/созревании F-белка предотвращает его перенос в клеточную мембрану.

На фиг. 18A-B показано, что нитазоксанид вызывает инсолубилизацию F белка вируса Хендра (HeV) и респираторно-синцитиального вируса (RSV).

(А) Вестерн-блоттинг для HeV-F и  $\alpha$ -тубулина клеток HeLa, ложнотрансфицированных или трансфицированных с помощью конструкции тегов HeV-F ORF C-Flag, экспрессирующей белок HeV-F, как описано в разделе "Материалы и методы", и обработанных 5 мкг/мл NTZ (C+), 2,5 мкг/мл туникамицина (TM) или носителем (C-). В. Вестерн-блоттинг для RSV-F и  $\alpha$ -тубулина клеток HeLa, ложнотрансфицированных (mock) или трансфицированных с помощью конструкции тегов RSV-F ORF C-Flag, экспрессирующей белок RSV-F, как описано в разделе "Материалы и методы", и обработанных 5 мкг/мл NTZ (C+), 2,5 мкг/мл туникамицина (TM) или носителем (C-). А, В. Показаны растворимые фракции клеточных лизатов, экстрагированные буфером-В ("растворимые") или суммарные лизаты клеток из параллельных образцов, извлеченных буфером Лэммли для образцов ("общие"), как описано в разделе "Материалы и методы". Белки HeV-F и RSV-F определяли с использованием анти-FLAG антител. Символами "Fp" обозначена более быстромигрирующая F-форма в обработанных TM клетках.

F-белок HeV и RSV был в основном обнаружен в нерастворимом состоянии в обработанных NTZ клетках, что указывает на то, что, подобно тому, как это происходит с F белком SeV, изменение в процессинге/созревании белка может привести к образованию агрегатов F-белка, присутствующих в нерастворимом состоянии.

На фиг. 19A-B показано, что нитазоксанид ингибирует перенос гликопротеина HeV-F и RSV-F к поверхности клетки.

(А) Уровни гликопротеинов плазматической мембраны HeV-F (красные) определяли через 24 ч p.i. с помощью конфокальной иммунофлуоресцентной микроскопии в непроницаемых клетках HeLa, ложнотрансфицированных или трансфицированных с помощью конструкции тегов HeV-F ORF C-Flag, экспрессирующей HeV-F белок, как описано в разделе "Материалы и методы", и обработанных 5 мкг/мл NTZ или носителем. В. Уровни гликопротеинов плазматической мембраны RSV-F (красные) определяли через 24 ч p.i. с помощью конфокальной иммунофлуоресцентной микроскопии в непроницаемых клетках HeLa, нетрансфицированных или трансфицированных с помощью конструкции тегов RSV-F ORF C-Flag, экспрессирующей RSV-F белок, как описано в разделе "Материалы и методы", и обработанных 5 мкг/мл NTZ или носителем. А, В. F-белки определяли с использованием анти-FLAG антител (красные). Ядра окрашены Хехстом (синие). Ложнотрансфицированные (Mock) клетки приведены в качестве контроля. Изображения были получены при помощи системы конфокального лазерного сканирования Olympus Fluoview FV-1000. Показано наложение двух флуорохромов.

Присутствие F-белка определяли на более низком уровне на поверхности клеток-хозяев, обработанных NTZ, что указывает на то, что, подобно тому, как это происходит с F белком SeV, изменение в процессинге/созревании HeV и RSV F белка предотвращает его перенос к клеточной мембране.

В случае инфицирования RSV было обнаружено, что нитазоксанид обладает противовирусной активностью против RSV-A2 в клетках HeLa в нецитотоксических дозах с IC<sub>50</sub> 0,3 мкг/мл и IC<sub>90</sub> 0,8 мкг/мл (для получения подробной информации о RSV-инфекции см. раздел "Материалы и методы"). Данные, представленные на фиг. 19A-B, схожи с данными, представленными на фиг. 10.

### **Подробное описание изобретения**

Сопутствующие документы.

Следующие документы, которые включены в настоящее описание посредством ссылки, могут быть полезны для понимания настоящего изобретения: патенты США №№ 9351937; 9126992; 9107913; 9023877; 8895752; 8846727; 8772502; 8633230; 8524278; 8124632; 7645783; 7550493; 7285567; 6117894; 6020353; 5968961; 5965590; 5935591; 5886013; 5859038; 5856348; 5387598; публикации заявок на патент США №№ 2015-025768; 2014-0065215; 2012-0294831; 2016-0243087; публикация PCT № WO 2016077420; J. Biol. Chem., 2009 Oct23; 284(43): 29798-29808; Antiviral Research, 110(2014): 94-103; Biochim Biophys Acta., 2003 Jul 11;1614(1):73-84.

Определения.

Если не указано иное, единственное число означает "один или более".

Используемый в настоящем документе термин "вирусная инфекция" описывает болезненное состояние, при котором вирус вторгается в здоровую клетку, использует репродуктивную систему клетки для размножения или репликации и в конечном итоге лизирует клетку, что приводит к гибели клетки, высвобождению вирусных частиц и инфицированию других клеток новообразованным вирусным потомством. Возможным результатом вирусной инфекции также является латентная инфекция некоторыми вирусами.

Острая вирусная инфекция обычно характеризуется быстрым началом заболевания, относительно коротким периодом симптомов и прекращением в течение нескольких дней до нескольких недель. Это обычно сопровождается ранним производством инфекционных вирионов и устранением инфекции иммунной системой хозяина. Острые вирусные инфекции являются причиной эпидемий болезней, от которых ежегодно страдают миллионы людей. Когда вакцины недоступны или не используются, может быть трудно контролировать острые инфекции, поскольку инфицированный человек обычно заразен еще до того, как заболит. Это затрудняет борьбу с острыми инфекциями в крупных популяциях и густонаселенных районах, таких как колледжи, дома престарелых, военные базы или суда. Дети, пожилые люди и люди с ослабленным иммунитетом более восприимчивы к осложнениям от этих инфекций, которые обычно являются самоограничивающимися.

Термин "заболевание или состояние, вызванное вирусом или связанное с ним" может относиться к вирусной инфекции, вызванной вирусом, и/или к одному или более ее симптомам, которые могут быть связаны с вирусной инфекцией.

Используемый в настоящем документе термин "лечение и/или предотвращение заболевания или состояния, вызванного вирусом или связанного с ним" может включать по меньшей мере одно из следующего: ингибирование репликации вируса, ингибирование передачи вируса, предотвращение закрепления вируса в хозяине, облегчение или ослабление симптомов или прогрессирования указанного заболевания, вызванного вирусом. Лечение считается терапевтическим, если есть хотя бы одно из снижения вирусной нагрузки, снижения смертности и/или заболеваемости, связанной с указанным заболеванием, снижения прогрессирования заболевания или более короткой продолжительности заболевания. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения "лечение и/или предотвращение заболевания или состояния, вызванного вирусом или связанного с ним" может включать повышенную выживаемость среди субъектов, пораженных заболеванием или состоянием, вызванным вирусом гриппа или связанным с ним, и получивших лечение активным агентом, таким как тиазолидное соединение, по сравнению с субъектами, пораженными заболеванием или состоянием, но не получившими лечения активным агентом. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения "лечение и/или предотвращение заболевания или состояния, вызванного вирусом или связанного с ним" может включать в себя снижение вирусной нагрузки у субъекта, пораженного заболеванием или состоянием, вызванным вирусом или связанным с ним, при введении активного агента. Однако в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения "лечение и/или предотвращение заболевания или состояния, вызванного вирусом или связанного с ним", может включать в себя улучшение или уменьшение симптомов или прогрессирования заболевания, вызванного вирусом.

### Описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что некоторые тиазолидные соединения могут быть эффективными против вирусов, принадлежащих к семействам Picornaviridae и Paramyxoviridae.

В частности, такие соединения могут быть полезны для лечения или предотвращения заболевания или состояния, вызванного вирусом, принадлежащим к семействам Picornaviridae и Paramyxoviridae, или связанного с указанным вирусом.

Семейство вирусов Picornaviridae.

Семейство Picornaviridae представляет собой (+)оцРНК семейство вирусов. Естественными носителями пикорнавирусов могут являться позвоночные, включая людей. В настоящее время в этом семействе насчитывается 50 видов, разделенных на 29 родов. Роды семейства Picornaviridae включают: род Aphthovirus (афтовирис), который включает вирус ринита крупного рогатого скота А (Bovine rhinitis A), вирус ринита крупного рогатого скота В (Bovine rhinitis B), вирус ринита лошадей А (Equine rhinitis A), вирус ящура; род Aquamavirus (аквамавирус), который включает Aquamavirus А; род Avihepatovirus, который включает вирус гепатита А уток; род Cardiovirus (кардиовирус), который включает вирус энцефаломиокардита, тейловирус, косавирус; род Discipivirus, который включает кадицивирус А; род Enterovirus (энтеровирус), который включает энтеровирусы А-Ј и риновирусы А-С; род Erbovirus (эрбовирус), который включает вирус ринита лошадей В (Equine rhinitis B); род Hepatovirus (гепатовирус), который включает вирус гепатита А; род Kobuvirus (кобувирус), который включает Aichivirus А, Aichivirus В и Aichivirus С; род Megrivivirus (мегривирус), который включает Melegrivirus А (мелегривирус А), парэховирус человека; вирус Льюнган; род Piscivirus, который включает пикорнавирус черного толстоголова; род Salivirus, который включает Salivirus А; род Sapelovirus (сапеловирус), который включает свиной сапеловирус, обезьяний сапеловирус и птичий сапеловирус; род Senecavirus (сенекавирус), который включает вирус Долины Сенека; род Teschovirus (тешовирус), который включает свиной тешовирус; род Tremovirus (тремовирус), который включает вирус птичьего энцефаломиелита. Заболевания, связанные с семейством

Picornaviridae, включают следующие: паралич (не полиомиелитной этиологии и не полиомиелитного типа), простуду летом, менингит, диарею, вызванную энтеровирусами; ящур (крупного рогатого скота), вызванный афтоввирусами; миокардит, вызванный кардиовирусами; обычную простуду, вызванную риновирусами; и гепатит, вызванный гепатовирусами. Заболевания, связанные с семейством Picornaviridae, включают следующие: паралич (не полиомиелитной этиологии и не полиомиелитного типа), простуду летом, менингит, диарею, вызванную энтеровирусами; ящур (крупного рогатого скота), вызванный афтоввирусами; миокардит, вызванный кардиовирусами; обычную простуду, вызванную риновирусами; и гепатит, вызванный гепатовирусами.

Род Enterovirus (энтеровирус).

Род энтеровирусов включает следующие 12 видов: энтеровирус А, энтеровирус В, энтеровирус С, энтеровирус D, энтеровирус Е, энтеровирус F, энтеровирус G, энтеровирус H, энтеровирус J, риновирус А, риновирус В, риновирус С. В этих 12 видах имеются серотипы: 1) вирус Коксаки: а) серотипы CV-A2, CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14 и CV-A16, обнаруженные у вида Enterovirus A; б) серотипы CV-B1, CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5, CV-B6 и CV-A9, обнаруженные у вида Enterovirus B; в) серотипы CV-A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22 и CV-A24, обнаруженные у вида Enterovirus C; 2) серотипы эховируса (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 и E-33, обнаруженные у вида Enterovirus B; 3) энтеровирус (Enterovirus) а) типы EV-A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-A92, EV-A114, EV-A119, SV19, SV43, SV46 и BA13, обнаруженные у вида Enterovirus A; б) типы 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 и SA5, обнаруженные у вида Enterovirus B; в) типы EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C116, EV-C117 и EV-C118, обнаруженные у вида Enterovirus C; д) типы EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 и EV-D120, обнаруженные у вида Enterovirus D; е) типы: EV-H1, обнаруженный у вида Enterovirus H; ф) типы: SV6, EV-J103, EV-J108, EV-J112, EV-J115 и EV-J121, обнаруженные у вида Enterovirus J; 4) риновирус человека а) типы 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 и HRV-A103, обнаруженные у вида Rhinovirus A; б) типы 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, и HRV-B99, обнаруженные у вида Rhinovirus B; в) типы 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 и HRV-C51, обнаруженные у вида Rhinovirus C; 5) серотипы полиовируса PV-1, PV-2 и PV-3, обнаруженные у вида Enterovirus C.

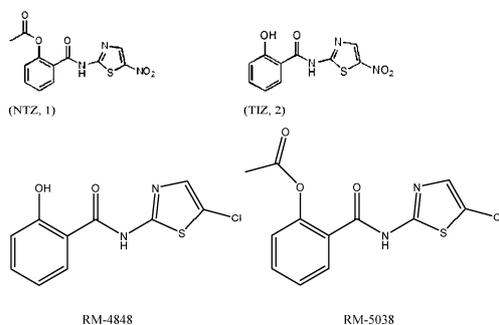
Вирусы Коксаки в основном связаны с ящуром человека. Вирусы Коксаки В могут вызывать признаки и симптомы, похожие на "простуду", но эти вирусы также могут привести к более серьезным заболеваниям, включая миокардит (воспаление сердца); перикардит (воспаление выстилающей сердце оболочки); менингит (воспаление мембран, которые соединяют головной мозг и спинной мозг); и панкреатит (воспаление поджелудочной железы). Эховирусы являются причиной многих неспецифических вирусных инфекций. Они обнаруживаются в основном в кишечнике и могут вызывать нервные расстройства. Обычными симптомами Коксаки и эховируса являются жар, легкая сыпь и умеренные болезненные состояния верхних дыхательных путей.

Заболевания, вызванные вирусами, принадлежащими к роду энтеровирусов, включают, но не ограничиваются ими, полиомиелит; полиомиелитоподобный синдром; неспецифическое лихорадочное заболевание, которое может характеризоваться одним или более из следующих симптомов: жар, мышечная боль, боль в горле, желудочно-кишечное расстройство/дискомфорт в области живота, головная боль; септический менингит; болезнь Борнхольма или эпидемическую плевродинию, которая может характеризоваться одним или несколькими из следующих симптомов: тяжелая пароксизмальная боль в груди и животе, жар, тошнота, головная боль и рвота; перикардит и/или миокардит, которые могут характеризоваться одним или более из следующих симптомов: жар, одышка и боль в груди; острый геморрагический конъюнктивит; герпетическую ангину, которая может характеризоваться одним или более из следующих симптомов: везикулярная сыпь в полости рта и глотки, жар, боль в горле, недомогание, дисфагия, потеря

аппетита, боли в спине и головная боль; ящур.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, может уменьшить продолжительность симптомов, вызванных респираторно-синцитиальным вирусом человека или связанных с ним. Например, тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, может уменьшать продолжительность симптомов, вызванных респираторно-синцитиальным вирусом человека или связанных с ним, по меньшей мере на 12 ч, или по меньшей мере на 24 ч, или по меньшей мере на 36 ч, или по меньшей мере на 48 ч, или по меньшей мере на 60 ч, или по меньшей мере на 72 ч, или по меньшей мере на 84 ч, или по меньшей мере на 96 ч, или по меньшей мере на 108 ч, или по меньшей мере на 120 ч, или по меньшей мере на 132 ч, или по меньшей мере на 144 ч. Например, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения продолжительность симптомов, вызванных респираторно-синцитиальным вирусом человека или связанных с ним, можно уменьшать на период от 12 до 144 ч, или от 24 до 132 ч, или от 36 до 120 ч, или от 48 до 108 ч, или от 60 до 96 ч, или от 66 до 90 ч, или от 72 до 84 ч, или на период любого поддиапазона или на значение в пределах этих диапазонов.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное тиазолидное соединение может представлять собой нитазоксанид (1, см. формулу ниже) или его фармацевтически приемлемую соль. Нитазоксанид в Соединенных Штатах одобрен для лечения инфекционного гастроэнтерита. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное тиазолидное соединение может представлять собой тизоксанид или его фармацевтически приемлемую соль, которая также приведена ниже



В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения нитазоксанид и тизоксанид можно применять совместно в комбинации.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное тиазолидное соединение может представлять собой RM-4848, который представляет собой замещенный тиазолид, имеющий ту же структуру, что и тизоксанид, но содержащий хлорогруппу вместо нитрогруппы, N-(5-хлортиазол-2-ил)-2-гидроксибензамид. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное тиазолидное соединение может представлять собой RM-5038, представляющее собой сложноэфирное пролекарство RM-4848. RM-4848 и RM-5038 описаны, например, в публикации заявки на патент США № 20120294831.

Тиазолидные соединения можно синтезировать, например, способами, опубликованным в патентах США №№ 3950351 и 6020353, PCT WO 2006042195 A1 и US 2009/0036467 A. Другие подходящие тиазолидные соединения описаны в патентах США №№ 7645783, 7550493, 7285567, 6117894, 6020353, 5968961, 5965590, 5935591 и 5886013.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения при применении против вируса, принадлежащего к семейству Paramyxoviridae, указанное тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, или RM-4848 и его сложный эфир (такой как RM5038), может снижать внутриклеточный уровень зрелого F-белка вируса. Например, при применении против вируса, принадлежащего к роду Respirivirus, такого как вирус Сендай, указанное тиазолидное соединение может снижать внутриклеточный уровень такого вирусного белка. При применении против вируса, принадлежащего к роду Pneumovirus, такого как респираторно-синцитиальный вирус, указанное тиазолидное соединение может снижать внутриклеточный уровень такого вирусного белка. При применении против вируса, принадлежащего к роду Heparavirus, такого как вирус Хендра, указанное тиазолидное соединение может снижать внутриклеточный уровень такого вирусного белка.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения при применении против вируса, принадлежащего к семейству Picornaviridae, такого как вирус, относящийся к роду Enterovirus, указанное тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно вводить вместе с противовирусным агентом прямого действия, ингибирующим репликацию вирусов, принадлежащих к семейству Picornaviridae.

Противовирусные агенты прямого действия включают, но не ограничиваются ими, ингибиторы 3С протеазы, такие как рупинтревир, пиразолы 17 и 18, и ингибиторы аналоги нуклеозидов, такие как МК-0608. Предпочтительно противовирусный агент прямого действия вводят в эффективном количестве, которое представляет собой количество, необходимое для достижения желаемого эффекта, когда указан-

ный противовирусный агент прямого действия применяют совместно с тиазолидным соединением, таким как нитазоксанид и/или тизоксанид.

Тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/тизоксанид, можно вводить одновременно или последовательно с ингибитором нейраминидазы.

Когда вирус относится к роду Enterovirus, введение тиазолидного соединения, такого как нитазоксанид и/или тизоксанид, отдельно или совместно с противовирусным агентом прямого действия, может ослаблять по меньшей мере один симптом заболевания или состояния, вызванного таким вирусом или связанного с ним, симптомом которого может быть, например, жар, кашель, боль в горле, заложенность носа, усталость, головная боль, миалгия и/или повышенная температура. Например, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, когда вирус относится к роду Enterovirus, введение тиазолидного соединения, такого как нитазоксанид и/или тизоксанид, отдельно или совместно с противовирусным агентом прямого действия может а) уменьшать жар, вызванный или связанный с заболеванием или состоянием, вызванным таким вирусом или связанным с ним, и б) ослаблять по меньшей мере один симптом такого заболевания или состояния, которым может быть, например, кашель, боль в горле, заложенность носа, усталость, головная боль, миалгия и/или повышенная температура. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, когда вводят тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, отдельно или совместно с ингибитором нейраминидазы, таким как осельтамивир, может а) уменьшать жар, вызванный указанным заболеванием или состоянием или связанный с ним, и б) ослаблять по меньшей мере один респираторный симптом, вызванный указанным заболеванием или состоянием или связанный с ним, и по меньшей мере один системный симптом, связанный с указанным заболеванием или состоянием, при этом указанный по меньшей мере один респираторный симптом выбран из кашля, боли в горле и/или заложенности носа, и указанный по меньшей мере один системный симптом выбран из усталости, головной боли, миалгии и повышенной температуры.

Термин "соль" может использоваться в самом широком смысле. Например, термин "соль" включает соли водорода и гидроксидные соли с ионами соединения по настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения "соль" может обозначать подкласс, который также называют фармацевтически приемлемыми солями, которые представляют собой соли соединений по настоящему изобретению, обладающие фармакологической активностью и которые не являются нежелательными ни биологически, ни каким-либо иным образом. Во всех вариантах реализации настоящего изобретения соли могут быть образованы с кислотами, например, без ограничения, водород, галогениды, ацетат, адипат, альгинат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептаноат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, оксалат, тиоцианат, тозилат и ундеканоат. Во всех вариантах реализации настоящего изобретения соли могут быть образованы с основаниями, например, без ограничения, гидроксид, соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли лития, натрия и калия, соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция, магния, соли алюминия, соли с органическими основаниями, такими как аммиак, метиламин, диэтиламин, этаноламин, дициклогексиламин, N-метилморфолин, N-метил-D-глюкамин и соли с аминокислотами, такими как аргинин и лизин. Основные азотсодержащие группы могут быть подвергнуты кватернизации с помощью агентов, включая низшие алкилгалогениды, такие как метил-, этил-, пропил- и бутилхлориды, бромиды и иодиды; диалкилсульфаты, такие как диметил-, диэтил-, дибутил- и диамилсульфаты; длинноцепочечные галогениды, такие как децил-, лаурил-, миристил- и стеарилхлориды, бромиды и иодиды; и аралкилгалогениды, такие как бензил- и фенетилбромиды.

Термины "терапевтически приемлемая соль" и "фармацевтически приемлемая соль" при использовании в настоящем документе относятся к солевым и цвиттерионным формам соединений по настоящему изобретению, которые являются водорастворимыми или диспергируемыми в воде, пригодными для лечения заболеваний без чрезмерной токсичности, раздражения и аллергической реакции, обладают разумным соотношением выгода/риск и эффективны для предполагаемого применения. Соли можно получать при окончательном выделении и очистке соединений или отдельно путем взаимодействия соответствующего соединения в форме свободного основания с подходящей кислотой. Типичные соли присоединения кислот включают ацетат, адипат, альгинат, L-аскорбат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат (безилат), бисульфат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, диглюконат, формиат, фумарат, гентизат, глутарат, глицерофосфат, гликолят, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, гиппурат, гидрохлорид, гидробромид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат (изетионат), лактат, малеат, малонат, DL-манделат, мезитиленсульфонат, метансульфонат, нафтиленсульфонат, никотинат, 2-нафталинсульфонат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфонат, пикрат, пивалат, пропионат, пироглутамат, сукцинат, сульфонат, тартрат, L-тартрат, трихлорацетат, трифторацетат, фосфат, глутамат, бикарбонат, паратолюолсульфонат (п-тозилат) и ундеканоат. Кроме того, основные группы в соединениях по настоящему изобретению могут быть кватернизированы метил-, этил-, пропил- и бутилхлоридами, бромидами и иодидами; диметил-, диэтил-, дибутил- и диамилсульфатами; децил-, лаурил-, миристил- и стерилхлоридами, бромидами и иодидами и бензил- и фенетилбромидами. Примеры кислот, которые можно при-

менять для получения терапевтически приемлемых солей присоединения кислот включают неорганические кислоты, такие как хлористоводородная, бромистоводородная, серная и фосфорная, и органические кислоты, такие как щавелевая, малеиновая, янтарная и лимонная. Соли также могут быть образованы путем координации соединений с ионом щелочного металла или щелочноземельного металла. Следовательно, настоящее изобретение предусматривает натриевые, калиевые, магниевые и кальциевые соли соединений по настоящему изобретению и тому подобное.

Соли присоединения оснований могут быть получены при окончательном выделении и очистке соединений путем взаимодействия карбоксильной, фенольной или аналогичной группы с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат металла, или с аммиаком или органическим первичным, вторичным или третичным амином. Катионы терапевтически приемлемых солей включают литий, натрий, калий, кальций, магний и алюминий, а также нетоксичные четвертичные аммониевые катионы, такие как аммиак, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, диэтиламин, этиламин, трибутиламин, пиридин, N,N-диметиланилин, N-метилпиперидин, N-метилморфолин, дициклогексиламин, прокаин, дибензиламин, N,N-дибензилфенетиламин, 1-эфенамин и N,N'-дибензилэтилендиамин. Другие типичные органические амины, пригодные для образования солей присоединения оснований, включают этилендиамин, этаноламин, диэтианоламин, пиперидин и пиперазин.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное тиазolidное соединение можно вводить в виде части фармацевтической композиции. Фармацевтическая композиция может содержать, в дополнение к тиазolidному соединению, носитель, такой как фармацевтически приемлемый носитель. Термин "носитель" может использоваться в самом широком смысле. Например, термин "носитель" относится к любым носителям, разбавителям, вспомогательным веществам, смачивающим агентам, буферным агентам, суспендирующим агентам, смазочным агентам, адьювантам, вспомогательным основам, системам доставки, эмульгаторам, разрыхлителям, абсорбентам, консервантам, поверхностно-активным веществам, красителям, ароматизаторам и подсластителям. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения носитель может представлять собой фармацевтически приемлемый носитель, термин более узкий, чем носитель, поскольку термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает нетоксичный носитель, который был бы подходящим для использования в фармацевтической композиции. Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях могут варьироваться так, чтобы вводить количество активного соединения (соединений), которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента.

Выборный уровень дозы может зависеть от активности тиазolidного соединения, способа введения, тяжести состояния, подлежащего лечению, и состояния и предшествующей истории болезни пациента, подлежащего лечению. Однако специалист в данной области техники может назначить начальные дозы соединения (соединений) на более низком уровне, чем требуется для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта. При желании эффективную суточную дозу можно разделить на несколько доз для целей введения, например от двух до четырех доз в сутки. Однако следует понимать, что удельный уровень дозы для любого конкретного пациента может зависеть от множества факторов, включая массу тела, общее состояние здоровья, диету, время и путь введения и комбинацию с другими терапевтическими агентами, а также степень тяжести состояния или заболевания, подлежащего лечению.

Фармацевтические композиции можно вводить системно, например, в пероральной композиции, такой как твердая пероральная композиция. Например, она может быть в физической форме порошка, таблетки, капсулы, пастилки, геля, раствора, суспензии, сиропа и т.п. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанная фармацевтическая композиция может быть в форме композиции, описанной в патентах США №№ 8524278 и 9351937. Такая композиция может содержать, например, часть с контролируемым высвобождением, содержащую тиазolidное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид; и часть с немедленным высвобождением, содержащую тиазolidное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид. Эти композиции можно вводить в виде разовой дозы или в нескольких дозах, которые вводят в разное время.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения общее количество тиазolidного соединения, такого как нитазоксанид и/или тизоксанид, в композиции может составлять от около 60 до 75 % по массе композиции. Композиция может быть приготовлена для немедленного высвобождения, контролируемого высвобождения или замедленного высвобождения. Указанные композиции могут содержать одну или несколько дополнительных фармацевтически приемлемых добавок или вспомогательных веществ. Эти вспомогательные вещества являются терапевтически инертными ингредиентами, которые хорошо известны в данной области. Используемый в настоящем документе термин "инертный ингредиент" может относиться к терапевтически инертным ингредиентам, которые хорошо известны в фармацевтической промышленности и которые можно применять отдельно или в различных комбинациях и которые включают, например, разбавители, разрыхлители, связующие, суспендирующие агенты, скользящие вещества, смазывающие вещества, наполнители, покрывающие агенты, солюбилизующий агент, подсластители, красители, ароматизаторы и антиоксиданты. См., например: Remington: The Science and

Practice of Pharmacy 1995, edited by E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19th edition, Easton, Pa.

Примеры разбавителей или наполнителей включают, но не ограничиваются ими, крахмал, лактозу, ксилит, сорбит, кондитерский сахар, прессованный сахар, декстраты, декстрин, декстрозу, фруктозу, лактит, маннит, сахарозу, тальк, микрокристаллическую целлюлозу, карбонат кальция, кальций фосфатный двухосновный или трехосновный, дикальцийфосфат дегидрат, сульфат кальция и т.п. Количество разбавителей или наполнителей может находиться в диапазоне от примерно 2 до примерно 15% от массы всей композиции.

Примеры дезинтегрирующих агентов включают, но не ограничиваются ими, альгиновую кислоту, метакриловую кислоту ДВБ, поперечно-сшитую ПВП, микрокристаллическую целлюлозу, кроскармеллозу натрия, кросповидон, полакрилин калия, натрий крахмалгликолят, включая кукурузный или маисовый крахмал, прежелатинизированный крахмал и т.п. Количество дезинтегрирующего агента (дезинтегрирующих агентов) обычно составляет от примерно 2 до примерно 15% от массы всей композиции.

Примеры связующих веществ включают, но не ограничиваются ими, крахмалы, такие как картофельный крахмал, пшеничный крахмал, кукурузный крахмал; микрокристаллическая целлюлоза; целлюлозы, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксизтилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза (НРМС), этилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия; природные камеди, такие как аравийская камедь, альгиновая кислота, гуаровая камедь; жидкая глюкоза, декстрин, повидон, сироп, полиэтиленоксид, поливинилпирролидон, поли-N-виниламид, полиэтиленгликоль, желатин, полипропиленгликоль, трагакант и т.п. Количество связующего вещества (связующих веществ) составляет от примерно 0,2 до примерно 14% от массы всей композиции.

Примеры скользящих веществ включают, но не ограничиваются ими, диоксид кремния, коллоидный безводный диоксид кремния, трисиликат магния, трехосновный фосфат кальция, силикат кальция, силикат магния, коллоидный диоксид кремния, порошкообразную целлюлозу, крахмал, тальк и тому подобное. Количество скользящего вещества (скользящих веществ) составляет от примерно 0,01 до примерно 0,3% от массы всей композиции.

Примеры смазывающих веществ включают, но не ограничиваются ими, стеарат магния, стеарат алюминия, стеарат кальция, стеарат цинка, стеариновую кислоту, полиэтиленгликоль, глицерилбегенат, минеральное масло, стеарилфумарат натрия, тальк, гидрогенизированное растительное масло и тому подобное. Количество смазывающего вещества (смазывающих веществ) составляет от примерно 0,2 до примерно 1,0% от массы всей композиции.

Указанные композиции могут содержать связующее, которое представляет собой низковязкий полимер. Примеры низковязких полимеров включают, но не ограничиваются ими, низковязкие полимеры гидроксипропилметилцеллюлозы, такие как те, которые доступны коммерчески от компании Dow Chemical под торговым названием Methocel™ (например, Methocel E50LV™, Methocel K100LVR™ и Methocel F50LVR™) и низковязкие полимеры гидроксизтилцеллюлозы. Низковязкий полимер обычно присутствует в количестве от примерно 10 до примерно 20%, или от примерно 10 до примерно 15%, или предпочтительно примерно 12% от общей массы всей композиции или в вариантах реализации настоящего изобретения с частями с контролируемым высвобождением и немедленным высвобождением низковязкий полимер в части с контролируемым высвобождением обычно присутствует в количестве от примерно 15 до примерно 20%, предпочтительно примерно 18% от массы части с контролируемым высвобождением.

Указанные композиции могут дополнительно содержать материал покрытия. Материалы покрытия обычно присутствуют в виде наружного слоя на лекарственной форме, который покрывает композицию полностью. Например, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанная лекарственная форма представляет собой таблетку для перорального приема, в которой часть с контролируемым высвобождением составляет первый слой таблетки, а часть с немедленным высвобождением составляет второй слой, который наносят поверх первого слоя с получением таблетки с ядром. В таких вариантах реализации, например, материал покрытия может находиться в виде внешнего слоя покрытия, который наносят поверх таблетки с ядром. Материал покрытия обычно составляет от примерно 1 до примерно 5% по массе композиции и может содержать гидроксипропилметилцеллюлозу и/или полиэтиленгликоль и одно или более вспомогательных веществ, выбранных из группы, включающей покрывающие агенты, непрозрачные вещества, маскирующие вкус средства, наполнители, полирующие агенты, красители, препятствующие прилипанию агенты и тому подобное. Примеры веществ пленочных покрытий и способы их применения хорошо известны специалистам в данной области техники.

Указанную композицию, содержащую тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно вводить в течение периода времени, подходящего для того, чтобы эффективно лечить заболевание или состояние, вызванное вирусом, принадлежащим к семейству Picornaviridae или связанного с ним, таким как вирус, относящийся к роду Enterovirus или вирусом, относящимся к семейству Paramyxoviridae. Указанные композиции можно применять в нескольких подходящих дозах и режимах. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения введение можно проводить в течение периода времени от примерно 3 дней до примерно 104 недель. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения введение можно проводить в течение периода времени более 104 недель и возможно даже

неограниченное время. Соответствующие режимы может определять врач.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения введение тиазолидного соединения, такого как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно начинать в течение 24 ч, или в течение 36 ч, или в течение 48 ч, или в течение 60 ч, или в течение 72 ч, или в течение 96 ч с момента начала у пациента, такого как человек, по меньшей мере одного симптома заболевания или состояния, вызванного вирусом, принадлежащим к семейству Picornaviridae или связанного с ним, таким как вирус, принадлежащий к роду Enterovirus, или вирусом, принадлежащим к семейству Paramyxoviridae. Например, для вируса, принадлежащего к роду Enterovirus, введение тиазолидного соединения, такого как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно начинать в течение 24 ч, или в течение 36 ч, или в течение 48 ч, или в течение 60 ч, или в течение 72 ч, или в течение 96 ч с момента начала у пациента, такого как человек, по меньшей мере одного симптома заболевания или состояния, вызванного таким вирусом или связанного с ним, при этом симптом может представлять собой, например, жар, кашель, боль в горле, заложенность носа, усталость, головную боль, миалгию и повышенную температуру.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения суточная доза тиазолидного соединения, такого как нитазоксанид и/или тизоксанид, вводимая человеку, может составлять от 100 до 1300 мг, или от 200 до 1200 мг, или от 250 до 1100 мг, или от 300 до 1000 мг, или любое значение дозы или поддиапазон в этих пределах. Примерные значения дозы включают 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 мг.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно вводить по меньшей мере в течение 2 дней, или по меньшей мере в течение 3 дней, или по меньшей мере в течение 4 дней, или по меньшей мере в течение 5 дней или по меньшей мере в течение 6 дней. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно вводить в течение периода от 2 до 14 дней, или от 3 до 10 дней, или от 4 до 7 дней, или любого значения или поддиапазона в этих пределах. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно вводить в течение 5 дней. Суточная доза тиазолидного соединения, такого как нитазоксанид и/или тизоксанид, может составлять от 300 до 900 мг, или от 400 до 800 мг, или от 500 до 700 мг, или любое значение дозы или поддиапазон в этих пределах. Примерные значения дозы включают 300, 400, 500, 600, 700 или 800 мг. Указанное тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно вводить один, два или три раза в сутки. В определенных случаях 600 мг нитазоксанида и/или тизоксанида можно вводить два раза в сутки. Указанное тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно вводить совместно с противовирусным агентом прямого действия против Picornaviridae, таким как рупинтревир или МК-0608, или противовирусным агентом прямого действия против респираторно-синцитиального вируса, таким как ингибитор слияния, GS-5806. Доза указанного противовирусного агента прямого действия может варьироваться. Указанный противовирусный агент прямого действия, такой как рупинтревир, МК-0608 или GS-5806, можно вводить один раз, два или три раза в сутки. В некоторых случаях 600 мг нитазоксанида и/или тизоксанида можно вводить два раза в сутки совместно с эффективным количеством указанного противовирусного агента прямого действия, вводимого два раза в сутки.

Тиазолидное соединение можно вводить субъекту, пораженному вирусом, принадлежащим к семейству Picornaviridae, таким как вирус, принадлежащий к роду Enterovirus. Такой субъект может представлять собой животного, включая человека.

Предпочтительно тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид, вводят субъекту, пораженному вирусом, принадлежащим к семейству Picornaviridae, такого как вирус, принадлежащий к роду Enterovirus, в эффективном количестве, что может означать количество, необходимое для достижения желаемого эффекта.

Варианты реализации настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, дополнительно проиллюстрированы следующими рабочими примерами, без ограничения.

#### **Примеры**

Семейство Paramyxoviridae включает множество важных вирусных патогенов человека, включая корь, эпидемический паротит, парагрипп, RSV (респираторно-синцитиальный вирус), метапневмовирусы и хенипавирусы, которые вызывают некоторые из самых смертоносных общих болезней животных и человека. Отсутствие эффективной противовирусной терапии подчеркивает необходимость новых лекарственных средств, эффективных против этих вирусов. Ранее было показано, что нитазоксанид (NTZ), безопасный, орально биодоступный тиазолид, лицензированный в США для лечения инфекций *Cryptosporidium parvum* и *Giardia lamblia*, обладает противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа. Авторы в настоящем документе исследовали активность NTZ и класс тиазолидов второго поколения (SGT), RM-4848 и RM-5038, в отношении инфекции Paramyxoviridae *in vitro* с использованием вирусов Сендай (SeV) и RSV-A2 в качестве моделей, и исследовали механизм противовирусного действия. Выход вируса определяли титрованием гемагглютинином и анализом инфекционности в клетках обезьяны и человека; жизнеспособность клеток определяли при помощи МТТ-теста. Синтез/созревание вирусного белка был охарактеризован при помощи SDS/PAGE-авторадиографией после мечения [<sup>35</sup>S]метионином,

иммунопреципитации и/или эндогенного расщепления, а также методом иммунофлуоресценции и вестерн-блоттинга в инфицированных клетках или в клетках, временно трансфицированных FLAG-меченым белком слияния (F) вируса Хендра (HeV).

NTZ и SGT показали замечательную противовирусную активность в отношении SeV, при этом они снижали выход вируса дозозависимо от SI в диапазоне от >50 до >625 в зависимости от MOI (множественности заражения) и защищали клетку-хозяина от повреждения, вызванного вирусом. Тиазолиды не влияли на проникновение вируса и не вызывали общее ингибирование синтеза вирусного белка, но ингибировали созревание и внутриклеточную транслокацию вирусных HN и F гликопротеинов. В частности, NTZ также вызывал снижение внутриклеточных уровней F-белка, что оказывает критическое влияние на слияние клеток и инфекционность вириона. Этот эффект не был вызван деградацией белка за счет системы убиквитин-протеасома или аутофагии, поскольку их не удалось "спасти" при помощи обработки ингибитором протеасом бортезомибом или ингибитором аутофагии хлорохином. Вместо этого было обнаружено, что SeV F белок присутствует в нерастворимом состоянии в клетках, обработанных NTZ, что указывает на то, что вызванный лекарственными средствами дефект созревания будет приводить к агрегации F белка. Что интересно, тиазолиды аналогичным образом влияли на F-белок вируса Хендра в клетках, временно экспрессирующих HeV-F с FLAG-метками в отсутствие вирусной инфекции, что позволяет предположить механизм, опосредованный клетками. Результаты показывают, что NTZ эффективен против инфекции парамиксовируса, действуя после входа вируса с помощью нового механизма, нацеленного на вирусные гликопротеины. Лечение NTZ также было эффективным против RSV, что указывает на общий эффект указанного лекарственного средства на членов семейства Paramyxoviridae. Результаты исследования представлены на фиг. 4-19.

Материалы и методы.

Культура клеток, лечение и трансфекции.

Эпителиальные альвеолярные тип-II-подобные клетки человека A549, клетки карциномы шейки матки HeLa и клетки почек африканской зеленой обезьяны (AGMK, клеточная линия 37RC) выращивались при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в среде RPMI (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, США) (AGMK, A549) или среде DMEM (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, США) (HeLa), дополненной 10% фетальной телячьей сывороткой (FCS), 2 mM глутамина и антибиотиками. Нитазоксанид (NTZ), тизоксанид (TZ) (Romark Laboratories, L.C.), ингибитор гликозилирования туникамицин (TM), ингибитор протеасомы бортезомиб и ингибитор аутофагии хлорохин (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США), растворенные в исходном растворе ДМСО (25 мг/мл), разбавляли в культуральной среде и добавляли к инфицированным клеткам сразу после одночасового периода адсорбции, если не указано иное. Соединения поддерживали в среде в течение всего эксперимента. Контроли получали равные количества носителя ДМСО, что не влияло на жизнеспособность клеток или репликацию вируса. Каждую концентрацию каждого соединения тестировали в двух повторностях и каждый эксперимент повторяли по меньшей мере дважды. Для экспериментов по трансфекции полуконфлюэнтные монослои клеток HeLa транзитивно трансфицировали с помощью конструкции на основе pCMV, содержащей ген, экспрессирующий F-белок респираторно-синцитиального вируса человека (RSV, подтип А, штамм А2), связанный с FLAG-тегом (тег RSV-F ORF C-Flag, Sino Biological Inc.), конструкции на основе pCMV, содержащей ген, экспрессирующий F-белок вируса Хендра (HeV), связанный с FLAG-тегом (тег HeV-F ORF C-Flag, Sino Biological Inc.) или вектором pCDNA3 в качестве контроля. Трансфекции проводили с использованием реагента трансфекции jet-PRIME (Polyplus transfection) в соответствии с инструкциями производителя.

Цитотоксичность.

Жизнеспособность клеток определяли при помощи анализа превращения 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-бифенилтетразолиум бромид (MTT) в формазан MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, США). Для анализа MTT восстановленный MTT (формазан) экстрагировали из клеток путем добавления 100 мкл изопропанола, содержащего 10% Тритона X-100, и измеряли абсорбционную способность формазана в считывателе микропланшетов ELISA на двух разных длинах волн (540 и 690 нм). 50% летальную дозу (LD<sub>50</sub>) рассчитывали с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (Graph-Pad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Микроскопическое исследование ложноинфицированных или инфицированных вирусом клеток проводили ежедневно, чтобы обнаружить индуцированный вирусом цитопатический эффект и возможные морфологические изменения и/или цитопротекцию, которую оказывает лекарственное средство. Микроскопические исследования проводились с использованием микроскопа Leica DM-IL, и изображения были получены при помощи камеры Leica DC 300 с использованием программного обеспечения Leica Image-Manager500.

Подготовка вируса, заражение и титрование.

Вирус Сендай (SeV) выращивали в аллантоидной полости 10-дневных яиц с развивающимися эмбрионами. Через 48 ч при температуре 37°C аллантоидную жидкость собирали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 мин для удаления клеточного дебриса, а титры вируса определяли при помощи титрования гемагглютинином (ГА) и анализа бляшкообразования в соответствии со стандартными процедурами (Bernasconi et al., 2005, Pica et al., 2000).

Для вирусной инфекции конфлюэнтные монослои клеток AGMK были инфицированы SeV в течение 1 ч при температуре 37°C при множественности заражения (MOI), составляющей 3 БОЕ (бляшкообразующая единица)/клетка, если не указано иначе. Аналогичные условия были использованы для инфицирования клеток A549 человека. После периода адсорбции вирусный инокулят удаляли, и монослои клеток три раза промывали фосфатно-буферным солевым раствором (PBS). Клетки содержали при температуре 37°C в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 2% фетальной телячьей сыворотки. Для многостадийных кривых роста вирусов конфлюэнтные монослои AGMK/A549 инфицировали SeV в течение 1 ч при температуре 37°C при MOI (множественности заражения) 0,01 БОЕ/клетка. После периода адсорбции вирусный инокулят удаляли, и монослои клеток три раза промывали фосфатно-буферным солевым раствором (PBS). Клетки содержали при температуре 37°C в культуральной среде RPMI 1640, содержащей 0,5% альбумина бычьей сыворотки (BSA) и трипсин (1 мкг/мл), обработанный L-1-тозиламид-2-фенилэтилхлорметилкетон (TPCK) (Sigma-Aldrich). Выход вируса определяли через 24 и 48 ч после инфицирования (p.i.) при помощи титрования ГА или анализа бляшкообразования, как описано ранее (Rossignol et al., 2009). Для анализа бляшкообразования готовили серийные 10-кратные разведения вируса и инокулировали в конфлюэнтные монослои AGMK-клеток в 35-мм планшетах (Corning, New York, NY, США). Через 1 ч при температуре 37°C инокулят удаляли и клетки трижды промывали PBS перед добавлением RPMI, содержащего 0,5% BSA, 1 мкг/мл трипсина, обработанного TPCK, и 0,5% агарозы SeaPlaque (Lonza). Через 72 ч при температуре 37°C покрывающий слой удаляли и клетки фиксировали 4% параформальдегидом в PBS и окрашивали 1% кристаллическим фиолетовым (Sigma-Aldrich). IC<sub>50</sub> (50% ингибирующей концентрации) и IC<sub>90</sub> (90% ингибирующей концентрации) указанных противовирусных соединений рассчитывали с использованием программного обеспечения Prism 5.0.

Пневмовирус человека RSV-A2 (респираторно-синцитиальный вирус, штамм A2) был предоставлен доктором Г. Томсом, Университет Ньюкасла, Ньюкасл-апон-Тайн, Великобритания. Для RSV-инфекции конфлюэнтные монослои клеток HeLa инфицировали в течение 1 ч при температуре 37°C посредством RSV-A2 при MOI 1 TCID<sub>50</sub> (50%-ная инфекционная доза в тканевой культуре)/клетка. Выход RSV-A2 оценивали путем подсчета количества индуцированных вирусом синцитий через 48 ч p.i. при определении анализом иммунофлуоресценции (IF) после маркировки моноклональным антителом, специфичным для белка слияния (F-белка) RSV (анти-F 1E3 антитело, Viratom Ltd., Ньюкасл-апон-Тайн, Великобритания). Для анализа IF неинфицированные и RSV-инфицированные монослои клеток HeLa фиксировали 4%-ным параформальдегидом (4% в PBS) в течение 30 мин при комнатной температуре. Фиксированные клетки инкубировали с анти-F 1E3 антителом в течение 1 ч при комнатной температуре. Несвязанное антитело удаляли промыванием в PBS, затем инкубировали с FITC-конъюгированным антимышиным антителом в течение 1 ч при комнатной температуре. После окрашивания клетки исследовали на флуоресцентном микроскопе Leica DM-II, оборудованном фильтрами возбуждения в УФ-области спектра. Фотографии были получены при помощи камеры Leica DC-300 с использованием программного обеспечения Leica Image-Manager500. Для каждого образца были подсчитаны по меньшей мере 150 синцитий. Было обнаружено, что нитазоксанид обладает противовирусной активностью против RSV-A2 в не цитотоксических дозах с IC<sub>50</sub> 0,3 мкг/мл и IC<sub>90</sub> 0,8 мкг/мл.

Метаболическая маркировка, анализ синтеза белка и вестерн-блоттинг.

Ложноинфицированные (mock) или инфицированные вирусом клетки были помечены 10 мКи/мл [<sup>35</sup>S]-метионинцистеина ([<sup>35</sup>S]-Met/Cys, Redivue Pro-Mix <sup>35</sup>S смесь для мечения клеток in vitro, GE Healthcare) в течение указанных периодов после 30 мин выдерживания на минимальной среде без метионина/цистеина. [<sup>35</sup>S]-Met/Cys определяли после клеточного лизиса в буфере радиоиммунного осаждения (RIPA) (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 4 mM ЭДТА, 1% Triton X-100, 600 mM KCl), содержащем 1 mM фенолметилсульфонилфторида (PMSF) и смесь ингибиторов протеазы (PIC; Applied Science Roche, Penzberg, Германия). Образцы с одинаковой радиоактивностью или содержащие то же количество белка, разделяли SDS/PAGE (3% концентрирующего геля, 10% разделяющего геля) и обрабатывали автордиографией, как описано (Pica et al., 2000). Автордиографии визуализировали и количественно определяли в Typhoon-8600 Imager [(Molecular Dynamics Phosphor-Imager™ (MDP)], и изображения получали с использованием программного обеспечения ImageQuant (Amersham Pharmacia Biotech) (анализ MDP).

Для анализа растворимых/нерастворимых белков экстракты из целых клеток (WCE) готовили после лизиса в экстрагирующем буфере с высоким содержанием соли (буфер В) (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 400 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 1 mM ЭГТА, 1% Triton X-100, 0,5% NP-40 и 10% глицерина) с добавлением 2 mM дитиотреитола (DTT), 20 mM β-глицеринфосфата, 19 mM (п-нитрофенилфосфат) PNPP, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF и коктейля ингибиторов протеазы (Roche) (Rossi et al., 2000). Клетки дважды промывали ледяным PBS и затем лизировали в буфере-В (80 мкл). После одного цикла замораживания и оттаивания и после центрифугирования при 15000 об/мин (15 мин при температуре 4°C) собирали фракции супернатанта (растворимые) и осадка (нерастворимые). Нерастворимые фракции солубилизировали в 60 мкл буфера-S (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1% SDS и ингибиторы протеазы) путем обработки ультразвуком на льду с использованием ультразвукового процессора UP50H (Hielscher) (40% амплитуда, импульсный режим: 6×10 с, паузы по 15 с). Общие экстракты были получены при лизисе клеток в буфере Лэммли с по-

следующим ДНК-фрагментированием при пропуске через шприц для инсулина с иглой калибра 28 1/2 (примерно 0,32 мм) 10 раз.

Для вестерн-блоттинга экстракты клеток (25 мкг) разделяли SDS-PAGE и наносили на нитроцеллюлозу, и фильтры инкубировали со следующими антителами: моноклональными анти-SeV-F (aF- $\gamma$ 236; ID Pharma) и анти- $\alpha$ -тубулиновыми (B-5-1-2, Sigma-Aldrich) антителами; поликлональными анти- $\alpha$ -тубулиновыми (11H10, Cell Signaling Technology Inc.), анти-FLAG (DYKDDDDK Tag, Cell Signaling Technology, Inc.) и анти- $\beta$ -актиновыми (Sigma-Aldrich) антителами с последующим окрашиванием меченым пероксидазой антикроличьим IgG, антикозьим IgG или антимышиным IgG (набор для определения SuperSignal, Pierce).

Иммунофлуоресцентная микроскопия.

SeV-инфицированные клетки AGMK или A549 и RSV-F- или HeV-F-трансфицированные клетки HeLa, выращенные на покровных стеклах, фиксировали 4%-ным параформальдегидом в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре через 24 ч p.i. Ложноинфицированные или ложнотрансфицированные клетки обрабатывали аналогичным образом. Фиксированные клетки инкубировали с анти-F моноклональными антителами (aF- $\gamma$ 236; ID Pharma) или анти-FLAG (DYKDDDDK tag, Cell Signaling Technology, Inc.), поликлональными антителами в течение 1 ч при температуре 37°C для окрашивания плазматической мембраны или их пермеабелизовали 0,1% TritonX-100-PBS в течение 10 мин при комнатной температуре и затем инкубировали с моноклональным анти-F и антикальнексином (Stressgene) или поликлональным анти- $\alpha$ -тубулином (11H10, Cell Signaling Technology Inc.) в течение 1 ч при температуре 37°C с последующим окрашиванием козьим антимышиным IgG, конъюгированным с Alexa Fluor488 (Molecular Probes-Invitrogen) или родамин-конъюгированным (Pierce) и родамин-конъюгированным козьим антикроличьим IgG (Pierce). Ядра окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) или Хехстом 33342 (Hoechst 33342, Molecular Probes, Invitrogen). Изображения были получены с помощью конфокальной лазерной сканирующей системы Olympus FluoviewFV-1000 с использованием программного обеспечения FluoView-1000.

Статистический анализ.

Статистический анализ проводили с использованием t-критерия Стьюдента для непарных данных. Данные выражаются как среднее  $\pm$ CO для двух параллельных образцов, р значения  $<0,05$  считались значимыми.

Список литературы.

- Bernasconi, D., Amici, C., La Frazia, S., Ianaro, A., and Santoro, M. G. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 24127-24134.
- La Frazia, S., Amici, C., and Santoro, M. G. (2006) *Antivir. Ther.* 11, 995-1004.
- Pica, F., Palamara, A. T., Rossi, A., De Marco, A., Amici, C., and Santoro, M. G. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 200-204.
- Rossi, A., Kapahi, P., Natoli, G., Takahashi, T., Chen, Y., Karin, M., and Santoro, M. G. (2000) *Nature* 403, 103-108.
- Rossignol, J. F., La Frazia, S., Chiappa, L., Ciucci, A., Santoro, M.G. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 29798-29808.

Исследование RM08-3002 (данные клинических испытаний для энтеровируса/риновируса).

В ходе рандомизированного исследования, проведенного в США, Канаде, Бельгии, Австралии и Новой Зеландии, изучали влияние NTZ, осельтамивира (OST), NTZ+OST и плацебо на время до ослабления симптомов у лиц в возрасте от 13 до 65 лет с неосложненным гриппом или заболеванием, подобным гриппу. 1941 субъект с жаром, по меньшей мере одним умеренным или тяжелым респираторным симптомом (кашель, боль в горле, заложенность носа) и по меньшей мере одним умеренным или тяжелым системным симптомом (повышенная температура, головная боль, миалгия, усталость, кашель, заложенность носа и боль в горле) были зарегистрированы как участники исследования в течение 48 ч после начала симптомов. На начальном уровне забирали мазки из носоглотки и подвергали бактериологическому исследованию и ОТ-ПЦР для выявления вирусных причин заболевания.

После регистрации в качестве участников исследования пациентам в случайном порядке назначали прием таблеток с пролонгированным высвобождением нитазоксанида (NTZ), капсул осельтамивира (OST), NTZ+OST или плацебо. Введение каждого лекарственного средства проводили два раза в сутки в течение 5 суток. Доза NTZ составляла 600 мг, а доза OST составляла 75 мг.

Пациенты регистрировали тяжесть своих симптомов два раза в сутки в течение как минимум 14 суток (симптом отсутствует, слабовыраженный, умеренный или тяжелый), и симптомы считались ослабленными тогда, когда все симптомы оценивались как отсутствующие или слабовыраженные и оставались такими как минимум 24 ч без использования ослабляющих симптомов лекарственных средств. Первичной конечной точкой исследования было время от первой дозы до ослабления симптомов.

На основании анализов ОТ-ПЦР (Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel) образцов мазков из

носоглотки было установлено, что у 251 субъекта единственной причиной заболевания является вирус из рода *Enterovirus* (в том числе энтеровирусы и риновирусы). Значения времени до начала ослабления симптомов для этих пациентов представлены на диаграмме анализа выживаемости Каплана-Мейера, представленной на фиг. 2.

Обе группы, которые принимали NTZ, показали статистически значимые ( $p < 0,05$ ) сокращения времени до ослабления симптомов по сравнению с пациентами, получавшими плацебо. Медианное сокращение времени до начала ослабления симптомов по сравнению с плацебо составляло примерно 47 ч.

Две группы, принимающие NTZ, были объединены и проведено сравнение с двумя группами, которые не получали NTZ (OST и плацебо). Пациенты, получавшие NTZ, показали значительное ( $p = 0,005$ ) снижение времени до начала ослабления симптомов по сравнению с теми пациентами, которые не принимали NTZ. Результаты этого сравнения приведены на фиг. 3.

На основании анализов ОТ-ПЦР (Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel) образцов мазков из носоглотки было установлено, что у 13 субъектов единственной причиной заболевания является респираторно-синцитиальный вирус. Время до начала ослабления симптомов, таких как жар, головная боль, миалгия, усталость, кашель, заложенность носа и боль в горле, для этих пациентов представлены на диаграмме анализа выживаемости по процедуре Каплана-Мейера, представленной на фиг. 1.

Хотя вышеизложенное относится к конкретным предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено только ими. Специалистам в данной области техники будет понятно, что описанные варианты реализации настоящего изобретения можно подвергать различным модификациям, и что такие модификации включены в объем настоящего изобретения.

Все публикации, патентные заявки и патенты, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения заболевания или состояния, вызванного вирусом, принадлежащим к роду *Enterovirus*, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из нитазоксанида, тизоксанида или их фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное введение ослабляет по меньшей мере один симптом указанного заболевания или состояния, выбранный из жара, кашля, боли в горле, заложенности носа, усталости, головной боли, миалгии и повышенной температуры.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный вирус выбран из энтеровирусов А-Е.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный вирус выбран из риновирусов А-С.

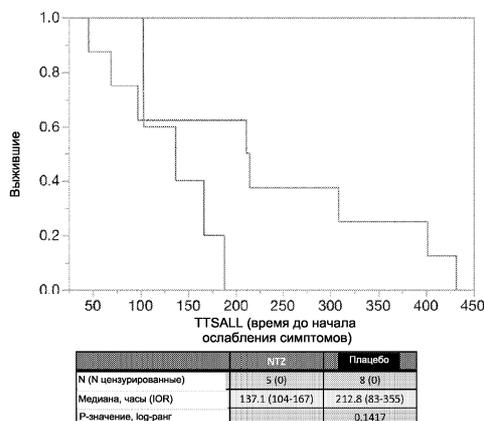
5. Способ по п.1, дополнительно включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества противовирусного агента прямого действия.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный противовирусный агент прямого действия представляет собой рупинтривир или МК-0608 или их фармацевтически приемлемую соль.

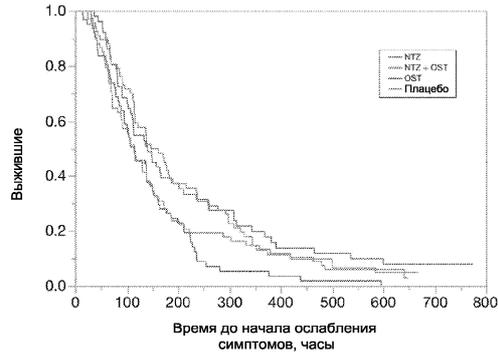
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное введение начинают в пределах 48 ч с момента возникновения у субъекта по меньшей мере одного симптома указанного заболевания или состояния, где указанный по меньшей мере один симптом выбран из жара, кашля, боли в горле, заложенности носа, усталости, головной боли, миалгии и повышенной температуры.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное введение сокращает время до начала ослабления симптомов указанного заболевания или состояния у субъекта.

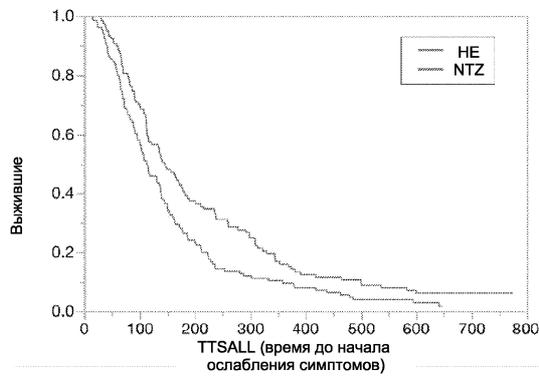


Фиг. 1



	NTZ	NTZ+OST	OST	Плацебо
N (цензурированные)	61 (1)	70 (5)	52 (5)	68 (7)
Медиана, часы (IOR)	115.6 (69-187)	114.1 (65-187)	141.3 (83-310)	162.5 (92-298)
P-значение против Плацебо				
Критер. Прентиса-Уилкоксона	0.0172	0.047	0.4169	-

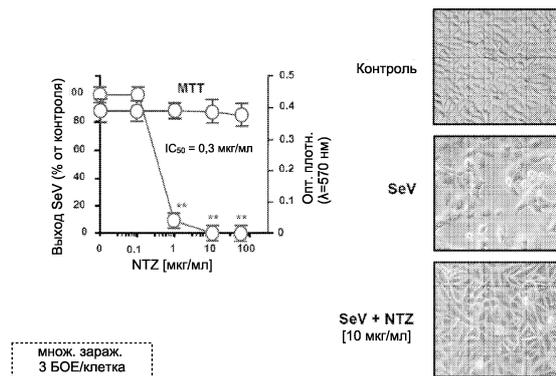
Фиг. 2



	NTZ группы	Не NTZ группы
N (цензурированные)	131 (6)	120 (12)
Медиана, часы (IOR)	114.5 (67-187)	146.5 (87-299)
Критер. Прентиса-Уилкоксона		0.0050

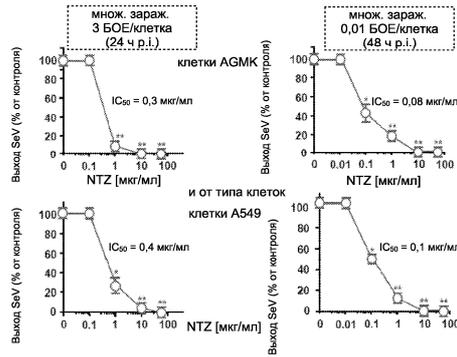
Фиг. 3

Противовирусная активность нитазоксанида в клетках AGMK, инфицированных SeV



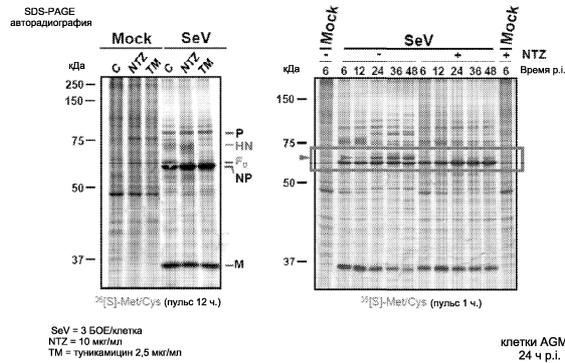
Фиг. 4А-В

Противовирусная активность нитазоксанида в клетках, инфицированных SeV, зависит от множественности заражения



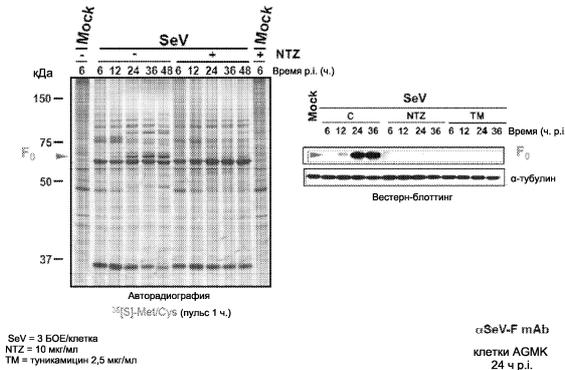
Фиг. 5

Влияние нитазоксанида на синтез белка SeV



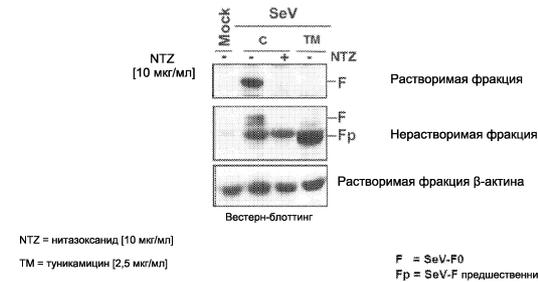
Фиг. 6

Влияние нитазоксанида на синтез белка SeV



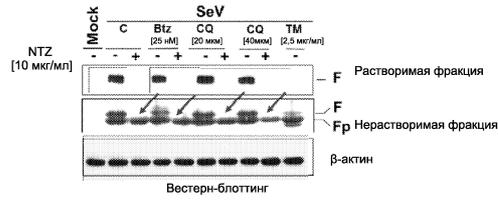
Фиг. 7

Определение незрелых форм белка SeV-F в нерастворимых фракциях белковых экстрактов AGMK после обработки NTZ



Фиг. 8

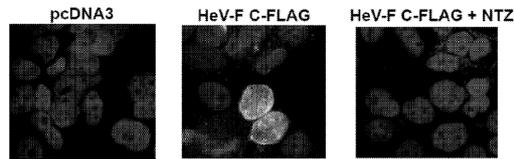
Определение незрелых форм белка SeV-F в нерастворимых фракциях белковых экстрактов AGMK после обработки NTZ



NTZ = нитазоксанид [10 мкг/мл]  
 TM = туникамидин [2,5 мкг/мл]  
 F = SeV-F0  
 Fp = SeV-F предшественник

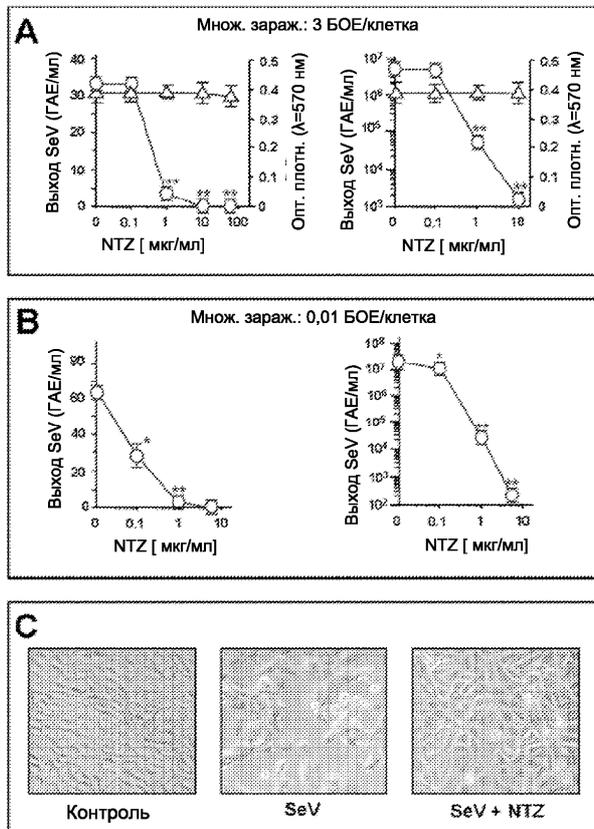
Фиг. 9

Нитазоксанид ингибирует транспорт гликопротеинов HeV F к поверхности клетки

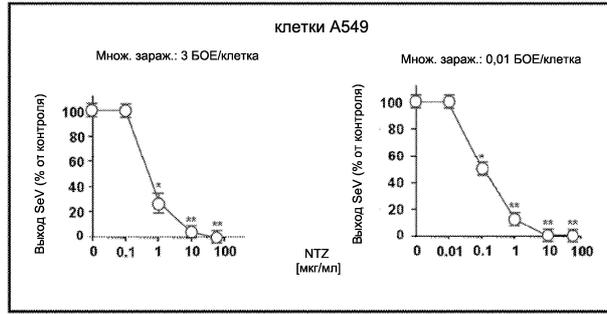


NTZ [10 мкг/мл]  
 Клетки HeLa

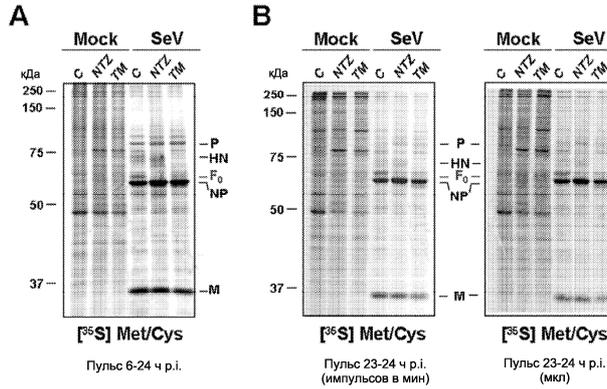
Фиг. 10



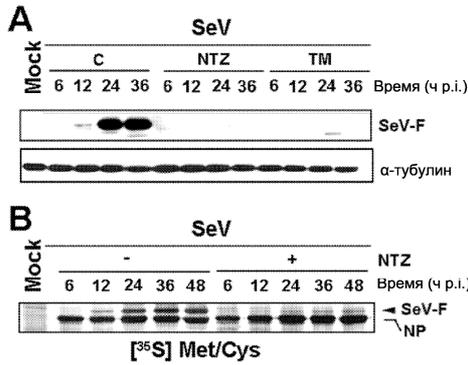
Фиг. 11А-С



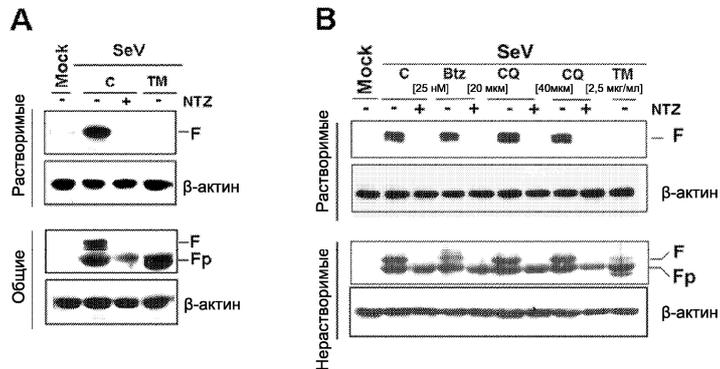
Фиг. 12



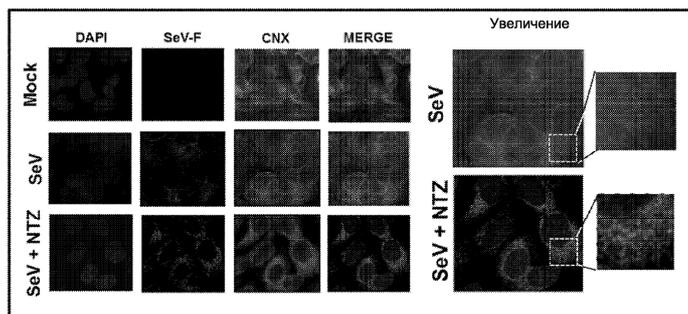
Фиг. 13А-В



Фиг. 14А-В

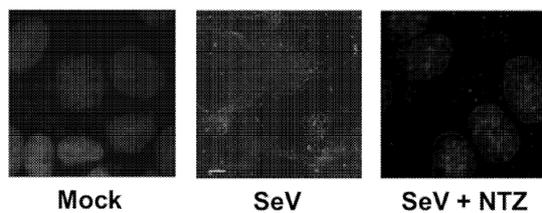


Фиг. 15А-В

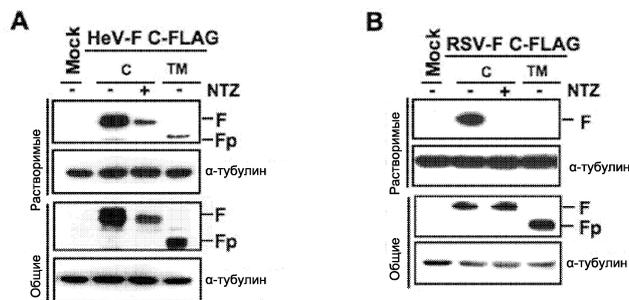


Фиг. 16

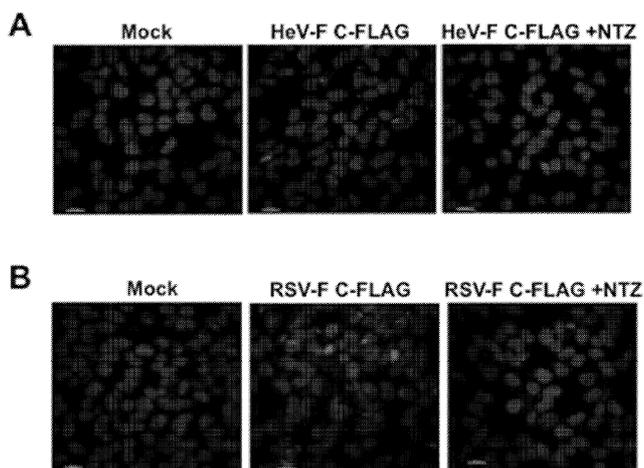
Мечение поверхности SeV-F



Фиг. 17



Фиг. 18А-В



Фиг. 19А-В

