

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091849** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.12.11

(51) Int. Cl. *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.03.30

(54) **ТИАЗОЛИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

(31) 62/316,463

(72) Изобретатель:

(32) 2016.03.31

**Россиньоль Жан-Франсуа, Санторо
Мария Габриэлла (US)**

(33) US

(62) 201891975; 2017.03.30

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Нилова М.И. (RU)

РОМАРК ЛАБОРАТОРИЗ Л.С. (US)

(57) Тиазолидные соединения, такие как нитазоксанид и/или тизоксанид, можно применять против вирусов, принадлежащих к семействам Picornaviridae или Paramyxoviridae.

A1

202091849

202091849

A1

ТИАЗОЛИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ПРИОРИТЕТ

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

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка в целом относится к тиазолидным соединениям, более конкретно к их применению для лечения определенных вирусных инфекций.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ лечения заболевания или состояния, вызванного вирусом семейства *Paramyxoviridae* или связанного с ним, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из нитазоксанида, тизоксанида или их фармацевтически приемлемой соли, при этом указанное эффективное количество представляет собой количество, которое блокирует созревание гликопротеина F вируса у субъекта.

Способ лечения заболевания или состояния, вызванного вирусом, принадлежащим к семейству *Picornaviridae*, или связанного с ним, включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из нитазоксанида, тизоксанида или их фармацевтически приемлемой соли.

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; с) осельтамивиром и d) 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 (○) определяли через 24 ч (А) или 48 ч (В) после инфицирования (р.і) при помощи титрования гемагглютинином (правые панели) и анализа бляшкообразования (левые панели). Выход вируса, выраженный в единицах ГА (ГAE)/мл или БОЕ/мл, представляет собой среднее \pm СО из четырех параллельных образцов. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$. Жизнеспособность контрольных ложноинфицированных клеток (Δ) определяли МТТ-тестом. (С) Цитопротекторный эффект NTZ (10 мкг/мл) в SeV-инфицированных клетках AGMK через 24 ч р.і.

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). Данные, 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 А549. Альвеолярные тип-II-подобные клетки человека А549, 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 (○) 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 А549, 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 p.i.) из ложноинфицированных (Mock) или SeV-инфицированных (SeV) клеток АГМК, обработанных 10мкг/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 час) через 24 ч p.i. 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 p.i. 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 F_0 (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 p.i. в инфицированных SeV клетках АГМК, обработанных 10 мкг/мл NTZ, 2,5 мкг/мл туникамицина (ТМ) или носителем (С). Показан также ложноинфицированный контроль (Mock). Уровни α -тубулина в тех же образцах показаны как контроль нагрузки. (В) Радиоавтография [^{35}S]Met/Cys-меченных белков (длительный импульс, 1 ч, начало в разное время p.i.) из ложноинфицированных (Mock) или SeV-инфицированных клеток АГМК, обработанных 10мкг/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 β -актина в ложноинфицированных или SeV-инфицированных клетках АГМК, 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 β -актина из растворимых и нерастворимых фракций экстрактов из целых клеток, полученных при экстракции буфером-В из клеток АГМК, 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 АГМК, обработанных NTZ (10 мкг/мл) или носителем в течение 24 часов, 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 АГМК, 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. 18А-В показано, что нитазоксанид вызывает инсолюбилизацию F белка вируса Хендра (HeV) и респираторно-синцитиального вируса (RSV).

А. Вестерн-блоттинг для HeV-F и α -тубулина клеток HeLa, ложнотрансфецированных или трансфецированных 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 α -тубулина клеток HeLa, ложнотрансфецированных (mock) или трансфецированных 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 «Fr» 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. 19А-В 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 непроницабилизированных клетках HeLa, ложнотрансфецированных или трансфецированных 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 непроницабилизированных клетках HeLa, нетрансфецированных или трансфецированных 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*). Ложнотрансфецированные (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 IC₅₀ 0,3 мкг/мл и IC₉₀ 0,8 мкг/мл (для получения подробной информации о RSV-инфекции см. раздел «Материалы и методы»). Данные, представленные на фиг. 19А-В, 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 № WO2016077420; J. Biol. Chem., 2009 Oct 23; 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 тиазolidные 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 (афтовирус), 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-J 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 Megrivirus (мегривирус), который включает Melegrivirus А (мелегривирус А), парэховирус человека; вирус Льюнган; род Piscevirus, который включает пикорнавирус черного толстоголова; род Salivirus, который

включает *Salivirus A*; 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 двенадцать 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 двенадцати 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; d) типы EV-D68, EV-D70, EV-D94, EV-D111 и EV-D120, обнаруженные у вида Enterovirus D; e) типы: EV-H1, обнаруженный у вида Enterovirus H; f) 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 плевродию, 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.

СЕМЕЙСТВО ВИРУСОВ PARAMYXOVIRIDAE

Семейство *Paramyxoviridae* представляет собой (-)оцРНК семейство вирусов. Естественными носителями парамиксовирусов являются люди, позвоночные и птицы. В настоящее время в этом семействе насчитывается 36 видов, разделенных на 18 родов. Заболевания, связанные с семейством *Paramyxoviridae*, включают: корь, эпидемический паротит, инфекции дыхательных путей. *Paramyxoviridae* делится на два подсемейства: *Paramyxovirinae* и *Pneumovirinae*. Роды семейства *Paramyxoviridae* включают: Род *Aquarparamyxovirus*, который включает парамиксовирус атлантического лосося; род *Avulavirus* (авулавирис), который включает птичьих парамиксовирусы 1-12, гусиный парамиксовирус и вирус ньюкаслской болезни; род *Ferlavirus*, который включает парамиксовирус Фер-де-Ланса; род *Henipavirus* (хенипавирус), который включает вирус Хендра, вирус Нипах и вирус Цедар; род *Morbillivirus* (морбилливирус), который включает вирус чумы плотоядных, морбилливирус китообразных, вирус кори, вирус чумы мелких жвачных животных, вирус тюленьей чумы, вирус чумы; род *Respirovirus* (респировирус), который включает вирус Сендай, вирус парагриппа человека типа 1 и вирус парагриппа человека типа 3; род *Rubulavirus* (рубулавирис), который включает вирус эпидемического паротита, вирус парагриппа человека

типа 2 и вирус парагриппа человека типа 4; вирусы, подобные парамиксовирусу тупайи (TPMV); род *Metapneumovirus* (метапневмовирус), который включает птичий метапневмовирус и метапневмовирус человека; род *Pneumovirus* (пневмовирус), который включает респираторно-синцитиальный вирус человека (HRSV), респираторно-синцитиальный вирус крупного рогатого скота, респираторно-синцитиальный вирус овец, респираторно-синцитиальный вирус коз, вирус пневмонии мышей.

Хенипавирусы, такие как вирус Хендра, вирус Нипах и вирус Цедар (Cedar) могут быть причиной болезней или даже смертей домашних животных, включая лошадей, кошачьих, свиней, а также людей.

Семейство *Paramyxoviridae* включает вирусы парагриппа человека (HPIV) типов 1-4. HPIV-1 может быть причиной крупа, также известного как ларинготрахеобронхит, который представляет собой тип респираторной инфекции. Инфекция может привести к отеку трахеи, препятствующему нормальному дыханию и вызывающему классические симптомы «лающего» кашля, стридора и хриплого голоса. Также возможны жар и насморк. HPIV-2 также может быть причиной крупа, который вызывает другие заболевания верхних и нижних дыхательных путей. HPIV-3 может быть причиной бронхиолита и пневмонии. HPIV-3 может в основном поражать маленьких детей, таких как дети в возрасте до 1 года. Бронхиолит - это воспаление бронхиол, самых маленьких воздушных проходов в легких. Он сопровождается кашлем, хрипами и/или одышкой, которые могут затруднять кормление некоторых детей. Пневмония - это воспалительное состояние легких, поражающее прежде всего микроскопические воздушные мешочки, известные как альвеолы. Типичные признаки и симптомы включают следующие (различной тяжести и в различных комбинациях): влажный или сухой кашель, боли в груди, жар и затрудненное дыхание, в зависимости от основной причины.

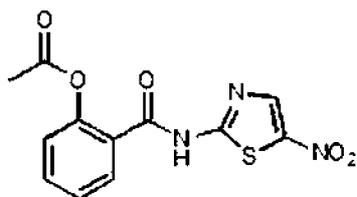
Вирус Сендай (SeV), также известный как вирус парагриппа мышей типа 1 или гемагглютинирующий японский вирус (HVJ), ответственен за инфекцию дыхательных путей с высокой передачей у мышей, хомяков, морских свинок, крыс и иногда свиней. Симптомы инфекции, вызванной вирусом Сендай, включают чихание, сгорбленность, угнетение дыхания, выделение порфирина из глаз и/или носа, летаргию, потерю веса и отставание в физическом развитии у выживших новорожденных крыс и молодых особей, анорексию.

Вирусы, принадлежащие к роду *Pneumovirus*, такие как респираторно-синцитиальный вирус человека, могут вызывать ряд заболеваний, с которыми связаны респираторные

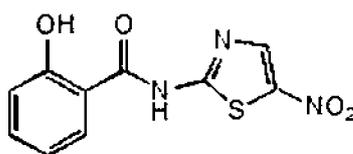
расстройства, которые могут варьироваться от менее тяжелых форм расстройств верхних дыхательных путей до тяжелого бронхолита или пневмонии. Симптомы таких заболеваний могут включать легкие симптомы, такие как ринит, кашель и снижение аппетита, и более серьезные симптомы, такие как хрипы, затрудненное дыхание, жар, бронхолит и пневмонию.

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 часов, или по меньшей мере на 24 часа, или по меньшей мере на 36 часов, или по меньшей мере на 48 часов, или по меньшей мере на 60 часов, или по меньшей мере на 72 часа, или по меньшей мере на 84 часа, или по меньшей мере на 96 часов, или по меньшей мере на 108 часов, или по меньшей мере на 120 часов, или по меньшей мере на 132 часа, или по меньшей мере на 144 часа. Например, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения продолжительность симптомов, вызванных респираторно-синцитиальным вирусом человека или связанных с ним, можно уменьшать на период от 12 часов до 144 часов, или от 24 часов до 132 часов, или от 36 часов до 120 часов, или от 48 часов до 108 часов, или от 60 часов до 96 часов, или от 66 часов до 90 часов, или от 72 часов до 84 часов или на период любого поддиапазона или на значение в пределах этих диапазонов.

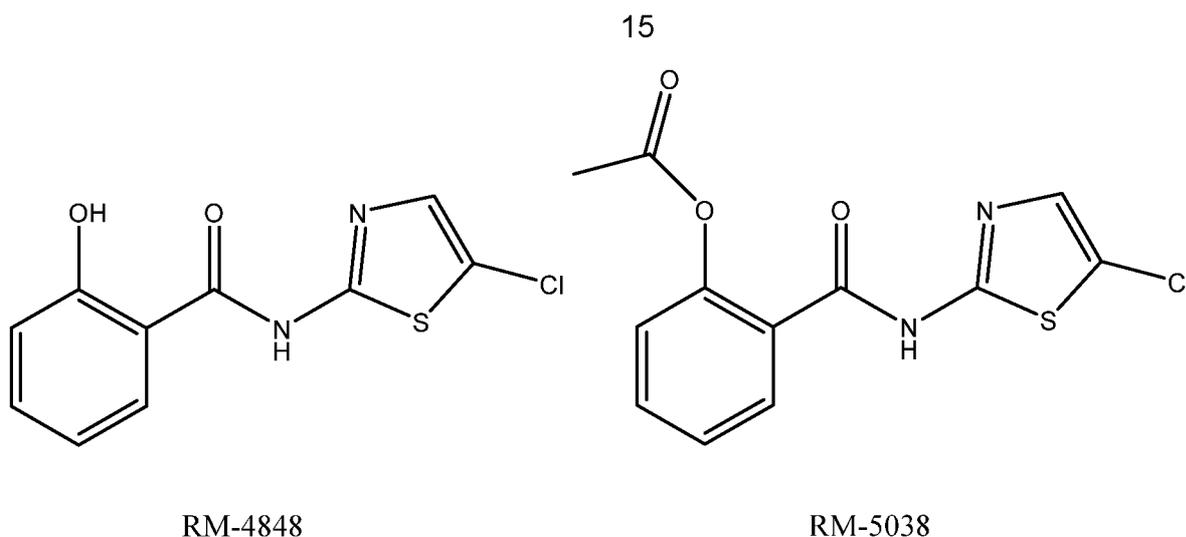
В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное тиазолидное соединение может представлять собой нитазоксанид (1, см. формулу ниже) или его фармацевтически приемлемую соль. Нитазоксанид в Соединенных Штатах одобрен для лечения инфекционного гастроэнтерита. В некоторых вариантах реализации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



(NTZ, 1)



(TIZ, 2)



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

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения указанное тиазolidное 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 тиазolidное 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 WO2006042195A1 и US2009/0036467A. 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 *Respirovirus*, 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 *Henipavirus*, 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 рупинтривир, 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 указанный противовирусный агент прямого действия применяют совместно с тиазолидным соединением, таким как нитазоксанид и/или тизоксанид.

Тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или 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 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 с 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, паратолуолсульфонат (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 применять 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-дибензилфенэтиламин, 1-эфенамин и N,N'-дибензилэтилендиамин. Другие типичные органические амины, пригодные для образования солей присоединения оснований, включают этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, 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-активными веществами, 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.

Выбранный 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 тиазолидное соединение, такое как нитазоксанид и/или тизоксанид; и часть с немедленным высвобождением, содержащую тиазолидное 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 тиазолидного 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, 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 MethocelTM (например, Methocel E50LVTM, Methocel K100LVRTM и Methocel F50LVRTM) и низковязкие полимеры гидроксипропилцеллюлозы. 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 присутствует 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 тиазolidное 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 часов, или в течение 36 часов, или в течение 48 часов, или в течение 60 часов, или в течение 72 часов, или в течение 96 часов 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 часов, или в течение 36 часов, или в течение 48 часов, или в течение 60 часов, или в течение 72 часов, или в течение 96 часов 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 мг до 1300 мг, или от 200 мг до 1200 мг, или от 250 мг до 1100 мг, или от 300 мг до 1000 мг, или любое значение дозы или поддиапазон в этих пределах. Примерные значения дозы включают 100 мг, 200 мг, 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг 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 мг до 900 мг, или от 400 мг до 800 мг, или от 500 мг до 700 мг, или любое значение дозы или поддиапазон в этих пределах. Примерные значения дозы включают 300 мг, 400 мг, 500 мг, 600 мг, 700 мг 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 рупинтривир 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 рупинтривир, 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*, или вирус, принадлежащий к семейству *Paramyxoviridae*. 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*, или субъекту, пораженному вирусом, принадлежащим к семейству *Paramyxoviridae*, 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 [³⁵S]метионином, иммунопреципитации и/или эндогенного расщепления, а также методом иммунофлуоресценции и вестерн-блоттинга в инфицированных клетках или в клетках, временно трансфецированных 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 была эффективной против RSV, что указывает на общий эффект указанного лекарственного средства на членов семейства *Paramyxoviridae*. Результаты исследования представлены на фиг. 4-19.

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% CO₂ 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 мМ глутамина и антибиотиками. Нитазоксанид (NTZ), тизоксанид (TIZ) (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 трансфецировали с помощью конструкции на основе pCMV, содержащей ген, экспрессирующий F-белок респираторно-синцитиального вируса человека (RSV, подтип A, штамм A2), 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 jetPRIME (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 (МТТ) в формазан МТТ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, США). Для анализа МТТ восстановленный МТТ (формазан) экстрагировали из клеток путем добавления 100 мкл кислого 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 (LD₅₀) 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 минут 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 конфлюентные монослои клеток AGMK были инфицированы SeV в течение 1 часа 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 конфлюентные монослои AGMK/A549 инфицировали SeV в течение 1 часа 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 конфлюентные 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 часа при

температуре 37°C покрывающий слой удаляли и клетки фиксировали 4% параформальдегидом в PBS и окрашивали 1% кристаллическим фиолетовым (Sigma-Aldrich). IC₅₀ (50% ингибирующей концентрации) и IC₉₀ (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 конфлюэтные монослои клеток HeLa инфицировали в течение 1 часа при температуре 37°C посредством RSV-A2 при MOI 1 TCID₅₀ (50%-ная инфекционная доза в тканевой культуре)/клетка. Выход RSV-A2 оценивали путем подсчета количества индуцированных вирусом синцитий через 48 часов 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 часа при комнатной температуре. Несвязанное антитело удаляли промыванием в PBS, затем инкубировали с FITC-конъюгированным антимышиным антителом в течение 1 часа 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 IC₅₀ 0,3 мкг/мл и IC₉₀ 0,8 мкг/мл.

Метаболическая маркировка, анализ синтеза белка и вестерн-блоттинг. Ложноинфицированные (mock) или инфицированные вирусом клетки были помечены 10мкКи/мл [³⁵S]-метионинцистеина ([³⁵S]-Met/Cys, Redivue Pro-Mix ³⁵S смесь для мечения клеток *in vitro*, GE Healthcare) в течение указанных периодов после 30 минут выдерживания на минимальной среде без метионина/цистеина. [³⁵S]-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 фенилметилсульфонилфторида

(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 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 400 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 1 % Triton X-100, 0,5% NP-40 и 10% глицерина) с добавлением 2 мМ дитиотреитола (DTT), 20 мМ β-глицеринфосфата, 19 мМ (п-нитрофенилфосфат) PNPP, 2 мМ Na₃VO₄, 1 мМ 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 солубилизовали в 60 мкл буфера-S (50 мМ Tris-НСl, рН 8,5, 1% SDS и ингибиторы протеазы) путем обработки ультразвуком на льду с использованием ультразвукового процессора UP50Н (Hielscher) (40% амплитуда, импульсный режим: 6 x 10 секунд, паузы по 15 секунд). Общие экстракты были получены при лизисе клеток в буфере Лэммли с последующим ДНК-фрагментированием при пропускании через шприц для инсулина с иглой калибра 28 ½ (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 (αF-γ236; ID Pharma) и анти-α-тубулиновыми (B-5-1-2, Sigma-Aldrich) антителами; поликлональными анти-α-тубулиновыми (11H10, Cell Signaling Technology Inc.), анти-FLAG (DYKDDDK Tag, Cell Signaling Technology, Inc.) и анти-β-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% параформальдегидом в PBS в течение 20 минут при комнатной

температуре через 24 часа p.i. Ложноинфицированные или ложнотрансфицированные клетки обрабатывали аналогичным образом. Фиксированные клетки инкубировали с анти-F моноклональными антителами (aF- γ 236; ID Pharma) или анти-FLAG (DYKDDDDK тег, Cell Signaling Technology, Inc.) поликлональными антителами в течение 1 часа при температуре 37°C для окрашивания плазматической мембраны, или их пермеабелизировали 0,1% TritonX-100-PBS в течение 10 минут при комнатной температуре и затем инкубировали с моноклональным анти-F и антикальнексином (Stressgene) или поликлональным анти- α -тубулином (11H10, Cell Signaling Technology Inc.) в течение 1 часа при температуре 37°C с последующим окрашиванием козьим антимышинным 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 Fluoview FV-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 СО для двух параллельных образцов. *p* 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 часов 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 часа без использования ослабляющих симптомы 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 часов.

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 семейству *Paramyxoviridae*, или связанного с указанным вирусом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из нитазоксанида, тизоксанида или их фармацевтически приемлемой соли, при этом указанное эффективное количество представляет собой количество, которое блокирует созревание у субъекта гликопротеина слияния (F) указанного вируса.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный вирус относится к роду *Respirovirus*.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой вирус Сендай.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный вирус относится к роду *Pneumovirus*.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой респираторно-синцитиальный вирус человека.

6. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанное введение ослабляет по меньшей мере один симптом указанного заболевания или состояния, выбранный из ринита, кашля, снижения аппетита, хрипов, затрудненного дыхания, жара, бронхоолита и пневмонии.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный вирус относится к роду *Henipavirus*.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой вирус Хендра.

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

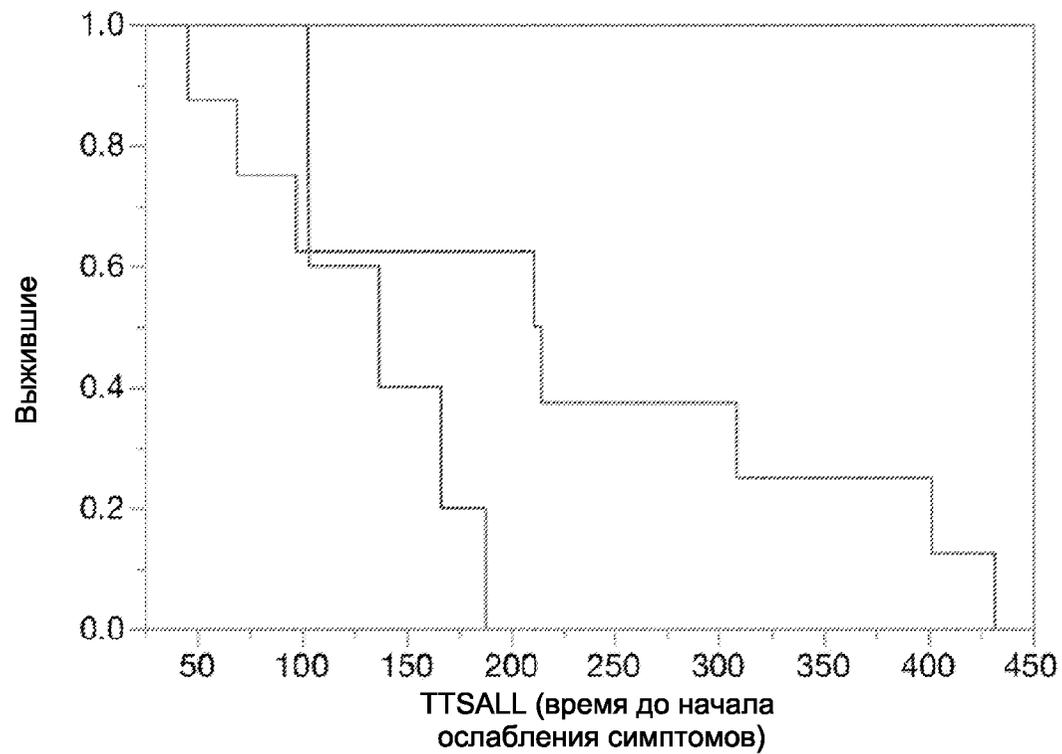
10. Способ лечения заболевания или состояния, вызванного вирусом, принадлежащим к роду *Henipavirus*, или связанного с указанным вирусом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно из нитазоксанида,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

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанный вирус представляет собой вирус Хендра.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанное терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое блокирует созревание у субъекта белка слияния (F) вируса.

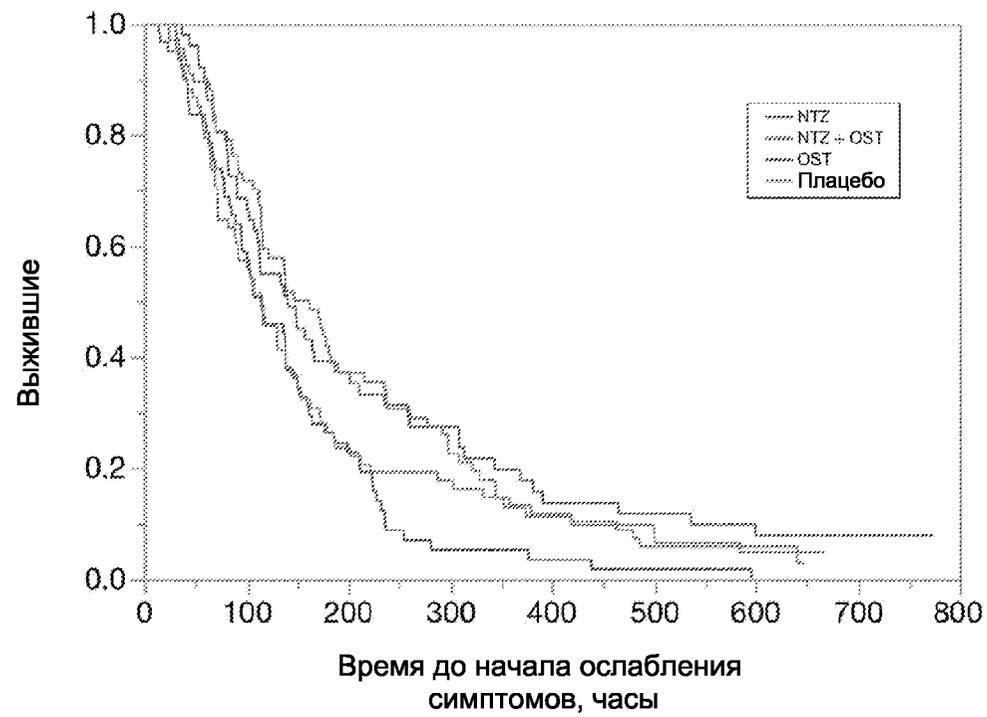
13. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

ФИГ. 1



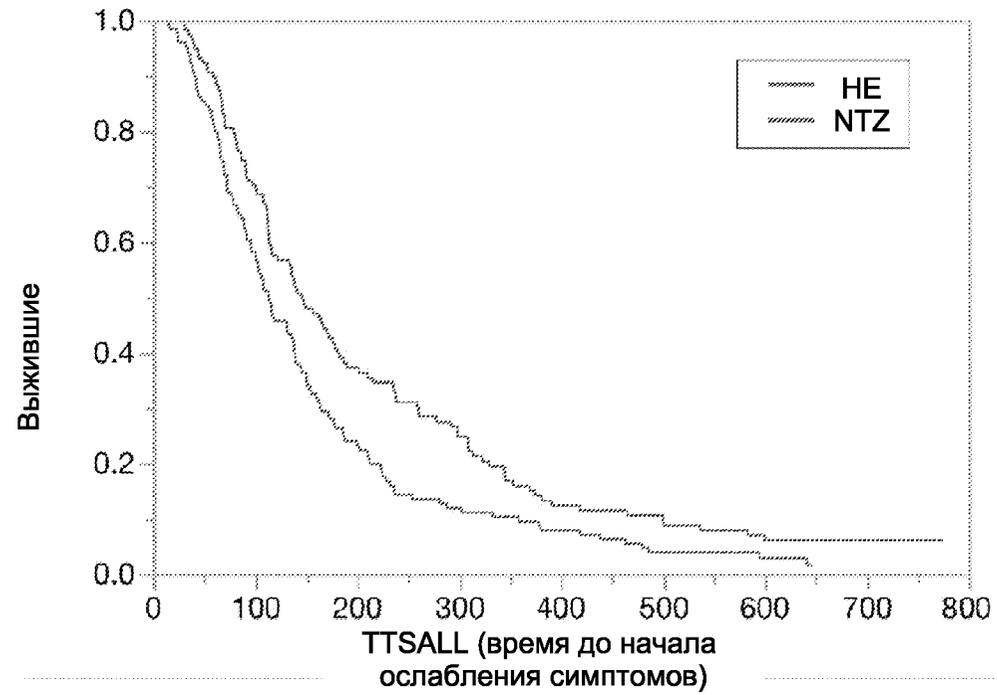
	ИТ2	Плацебо
N (N цензурированные)	5 (0)	8 (0)
Медиана, часы (IQR)	137.1 (104-167)	212.8 (83-355)
P-значение, log-ранг		0.1417

ФИГ. 2



	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	

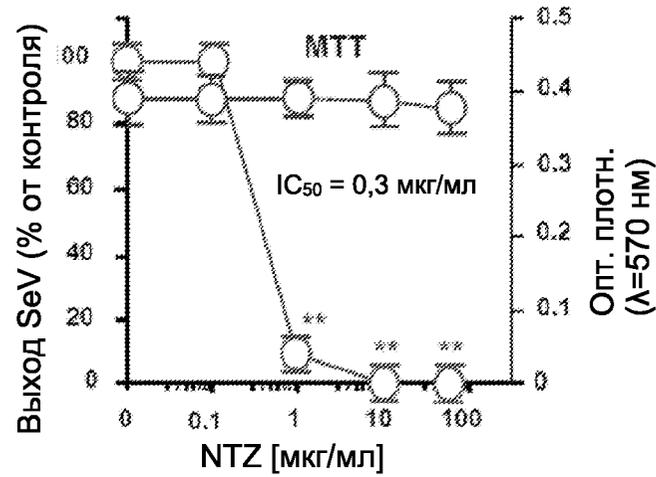
ФИГ. 3



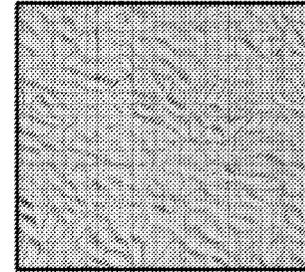
	NTZ группы	He NTZ группы
N (цензурированные)	131 (6)	120 (12)
Медиана, часы (IQR)	114.5 (67-187)	146.5 (87-299)
Критер. Прентиса-Уилкоксона		0.0050

ФИГ. 4А-В

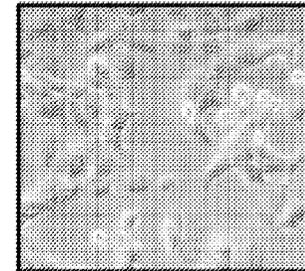
Противовирусная активность нитазоксанида в клетках AGMK, инфицированных SeV



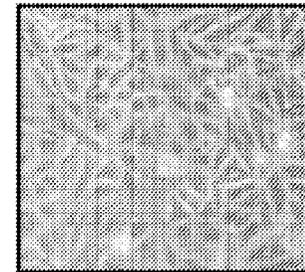
Контроль



SeV



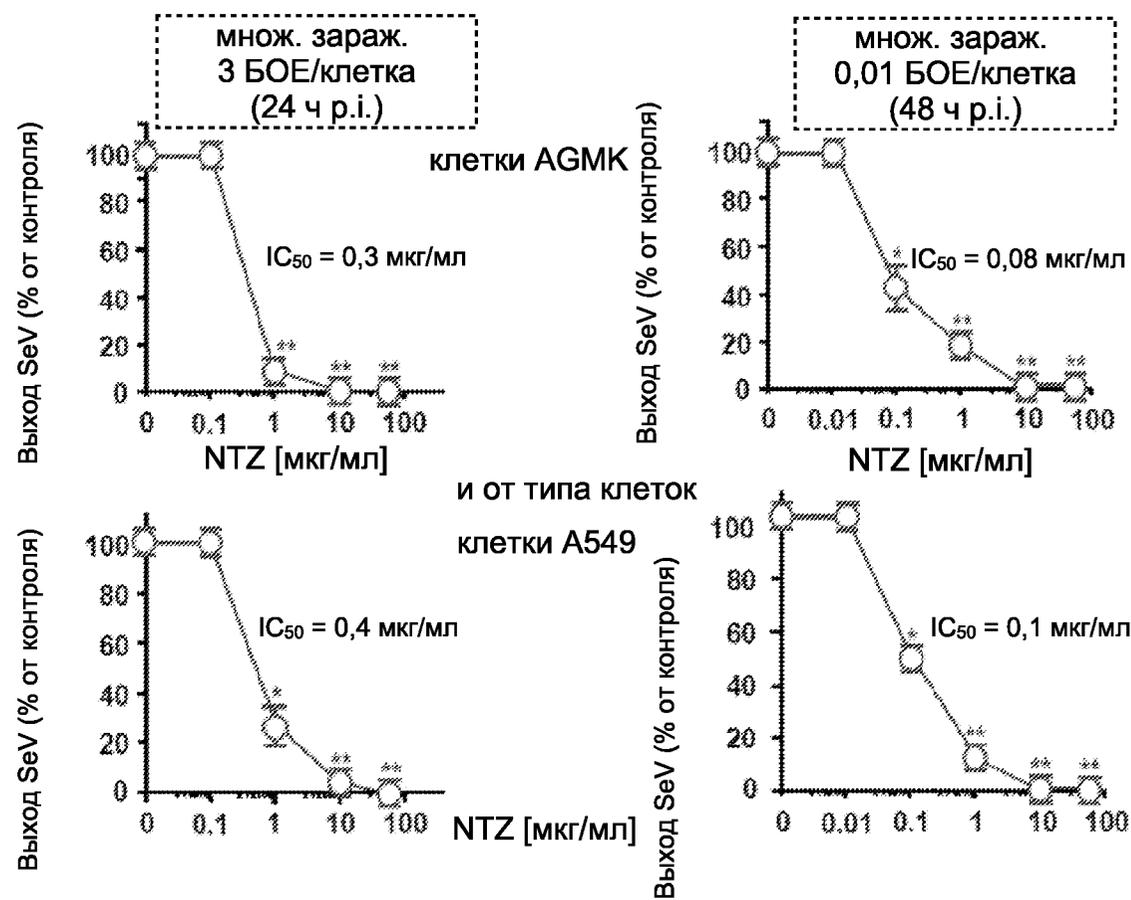
SeV + NTZ
[10 мкг/мл]



множ. зараж.
3 БОЕ/клетка
(24 ч p.i.)

ФИГ. 5

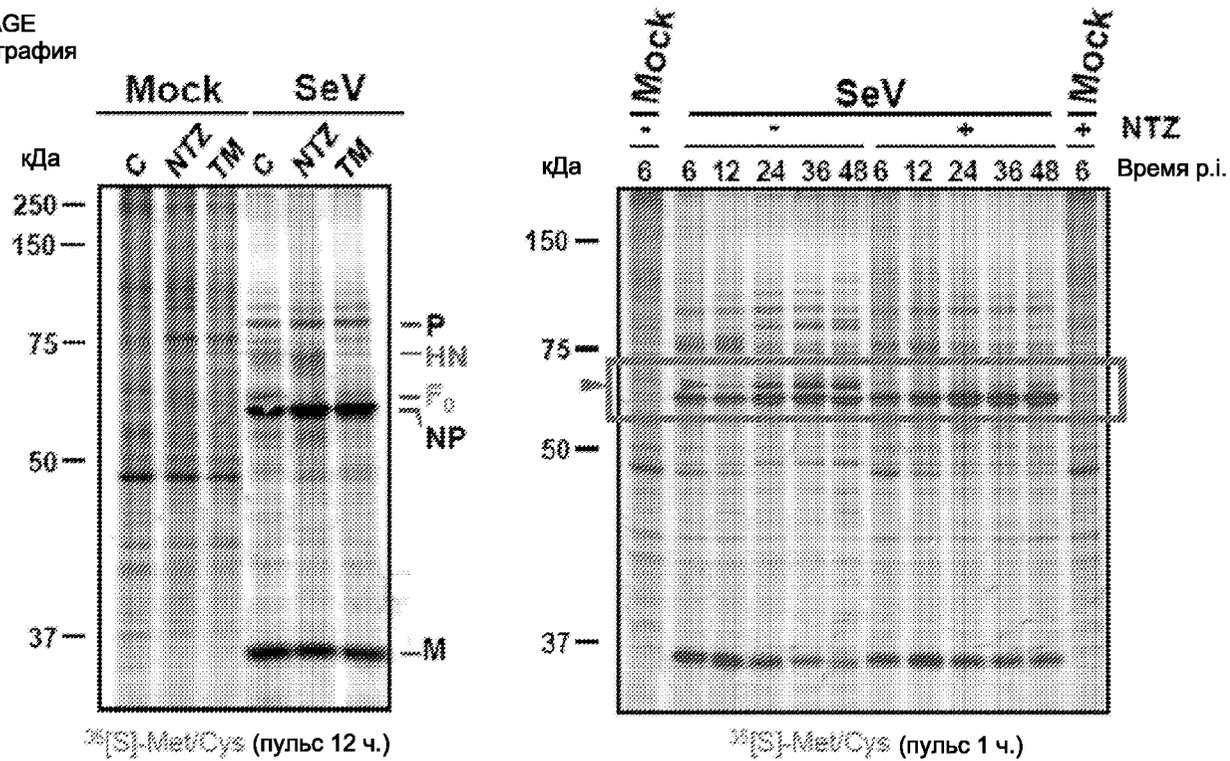
Противовирусная активность нитазоксанида в клетках, инфицированных SeV, зависит от множественности заражения



ФИГ. 6

Влияние нитазоксанида на синтез белка SeV

SDS-PAGE
автордиография

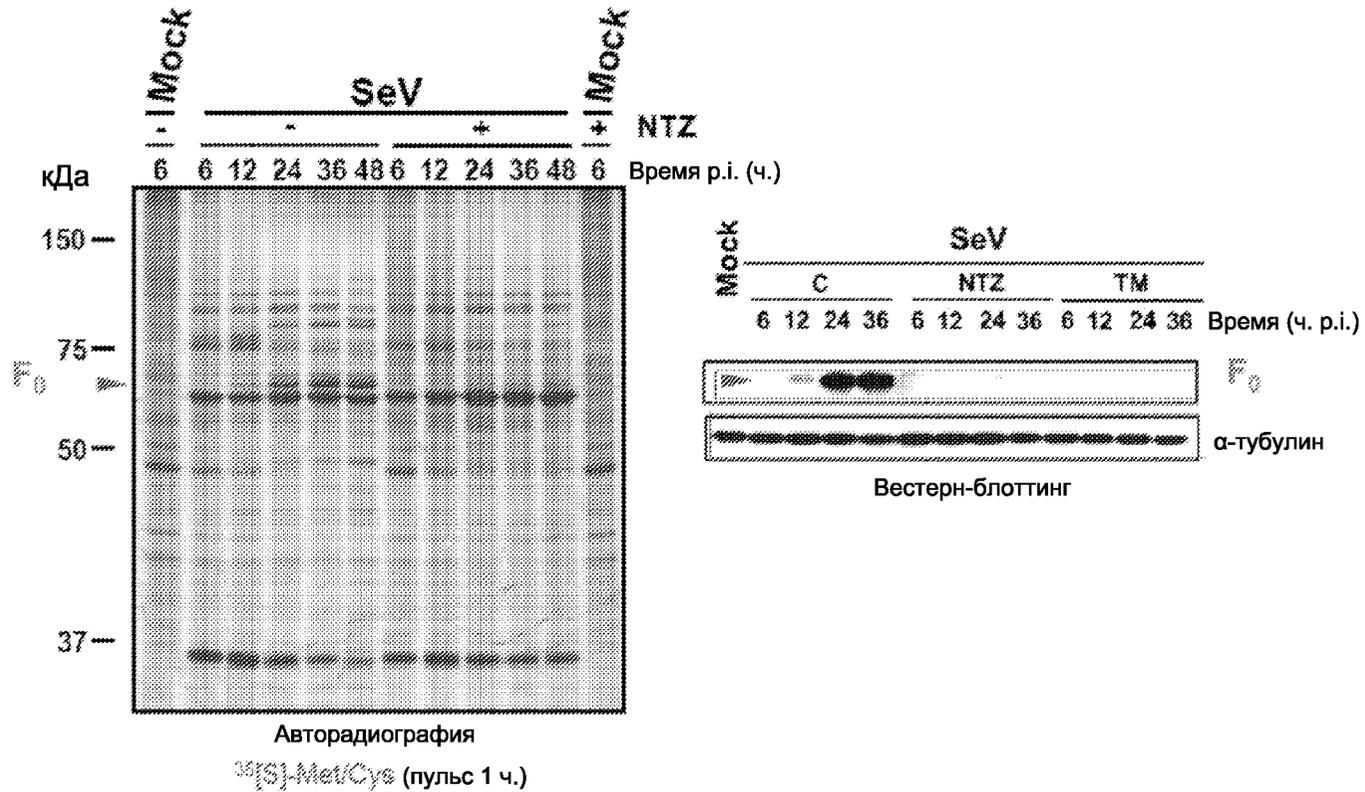


SeV = 3 БОЕ/клетка
NTZ = 10 мкг/мл
TM = туникамицин 2,5 мкг/мл

клетки АГМК
24 ч р.и.

ФИГ. 7

Влияние нитазоксанида на синтез белка SeV



SeV = 3 БОЕ/клетка
 NTZ = 10 мкг/мл
 TM = туникамицин 2,5 мкг/мл

$\alpha\text{SeV-F mAb}$
 клетки AGMK
 24 ч п.и.

ФИГ. 8

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



NTZ = нитазоксанид [10 мкг/мл]

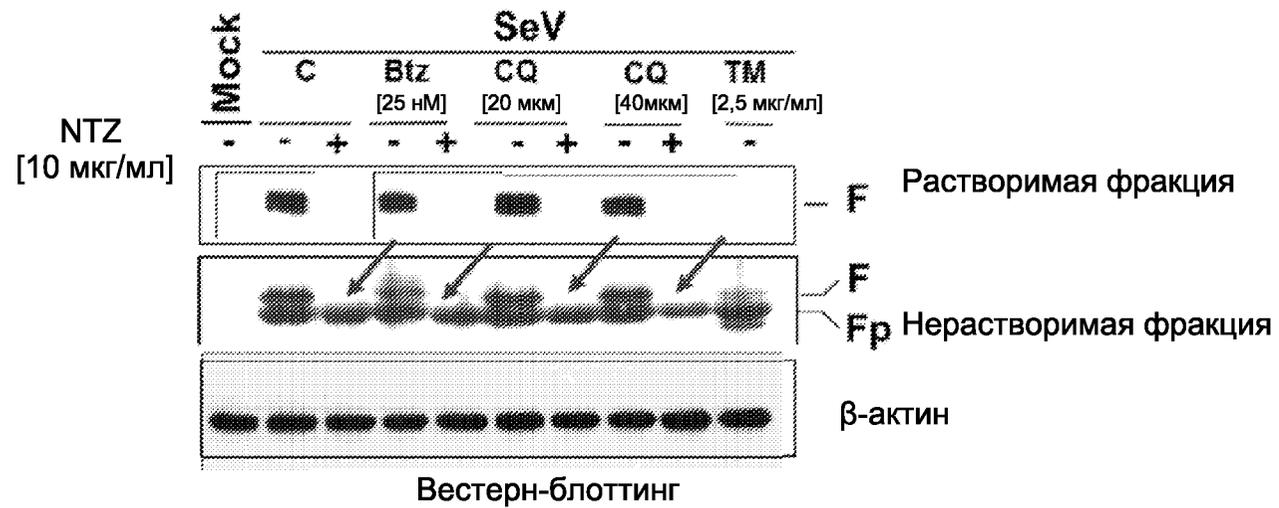
TM = туникамицин [2,5 мкг/мл]

F = SeV-F0

Fp = SeV-F предшественник

ФИГ. 9

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



NTZ = нитазоксанид [10 мкг/мл]

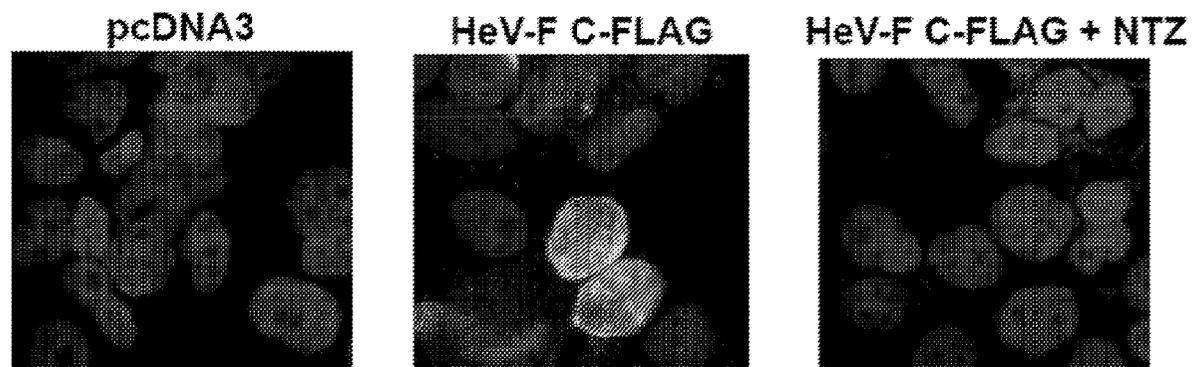
TM = туникамицин [2,5 мкг/мл]

F = SeV-F0

Fp = SeV-F предшественник

ФИГ. 10

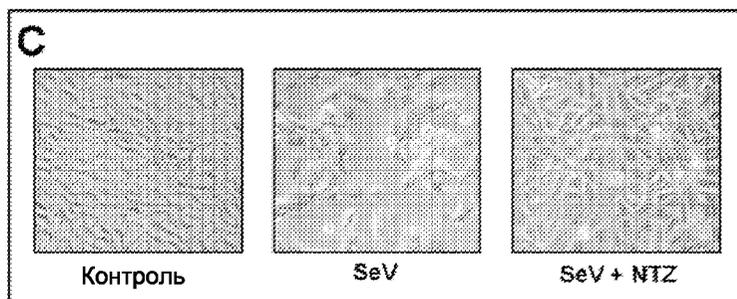
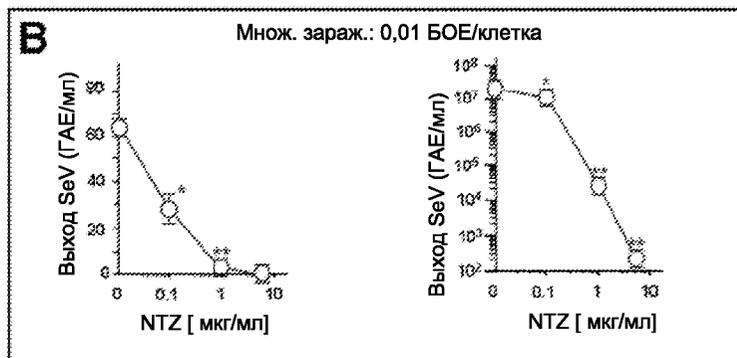
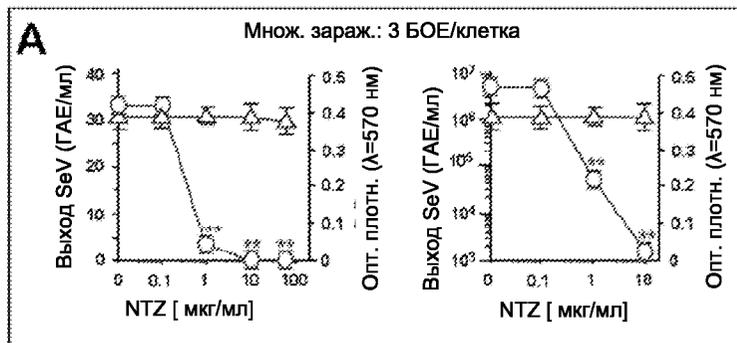
Нитазоксанид ингибирует транспорт гликопротеинов HeV F к поверхности клетки



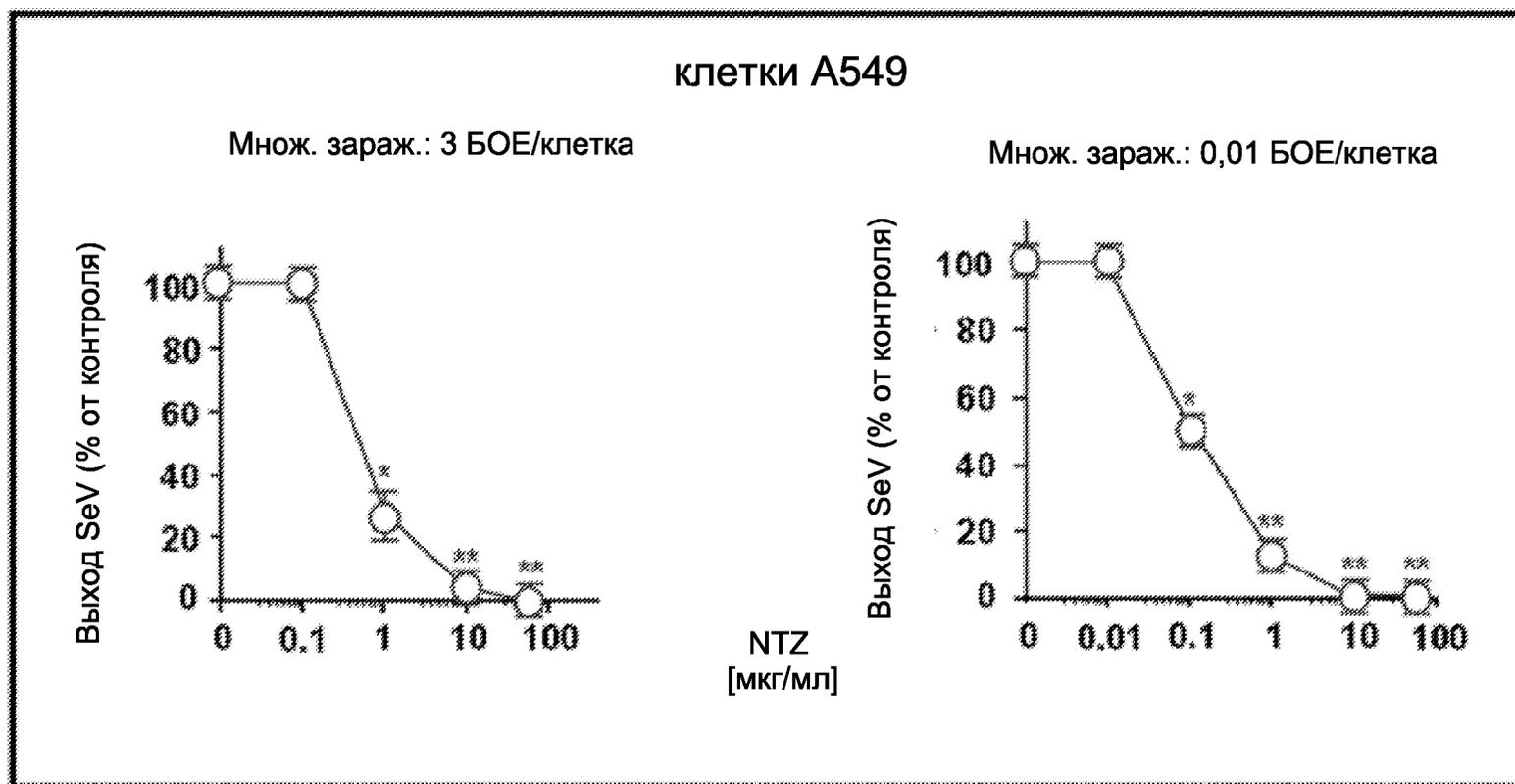
NTZ [10 мкг/мл]

Клетки HeLa

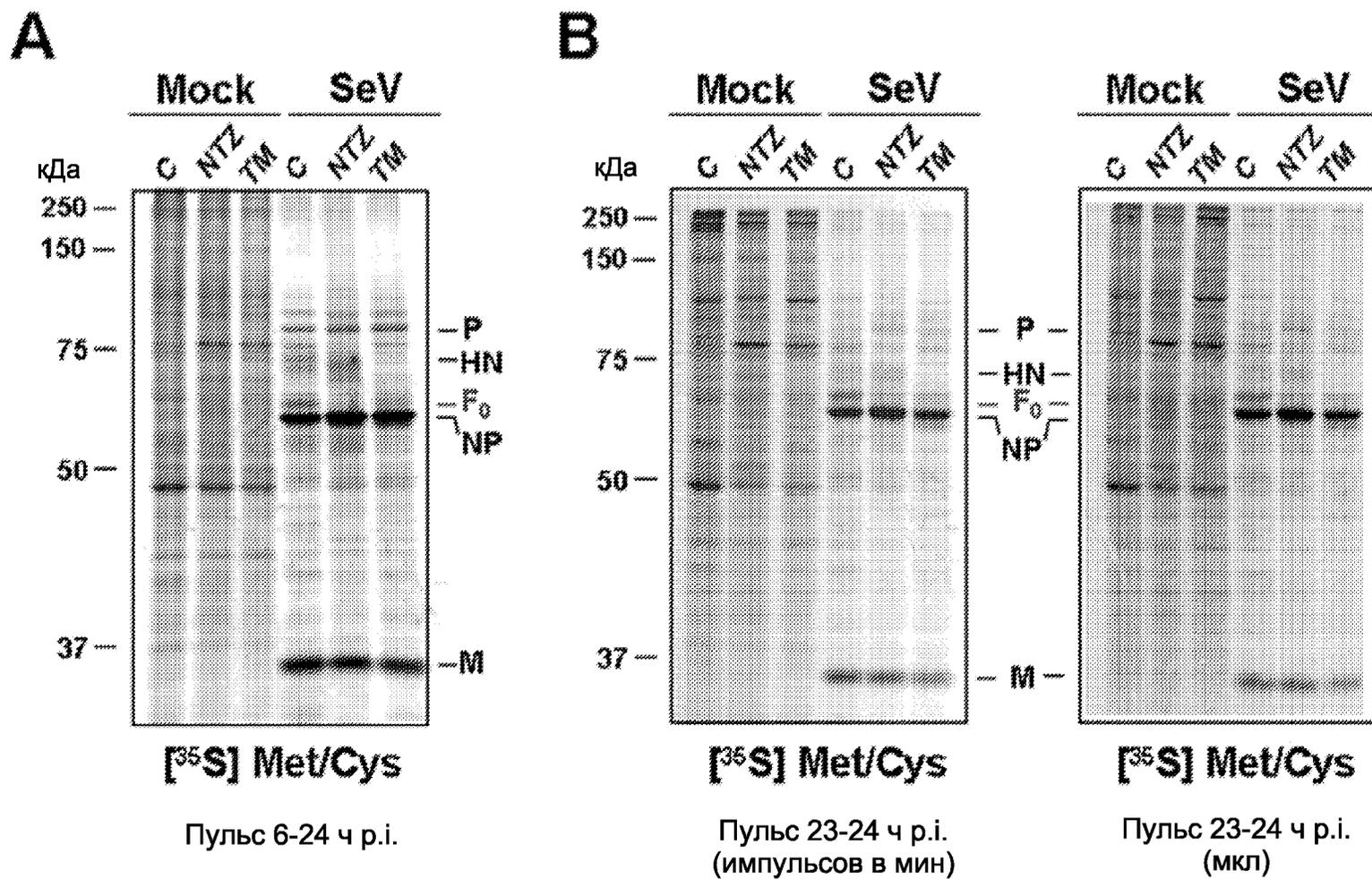
ФИГ. 11А-С



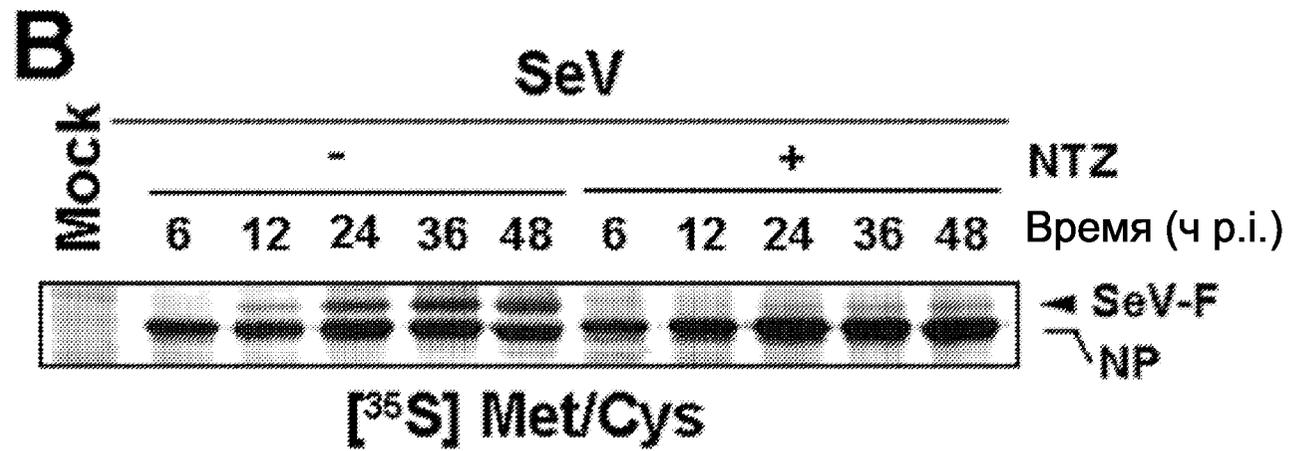
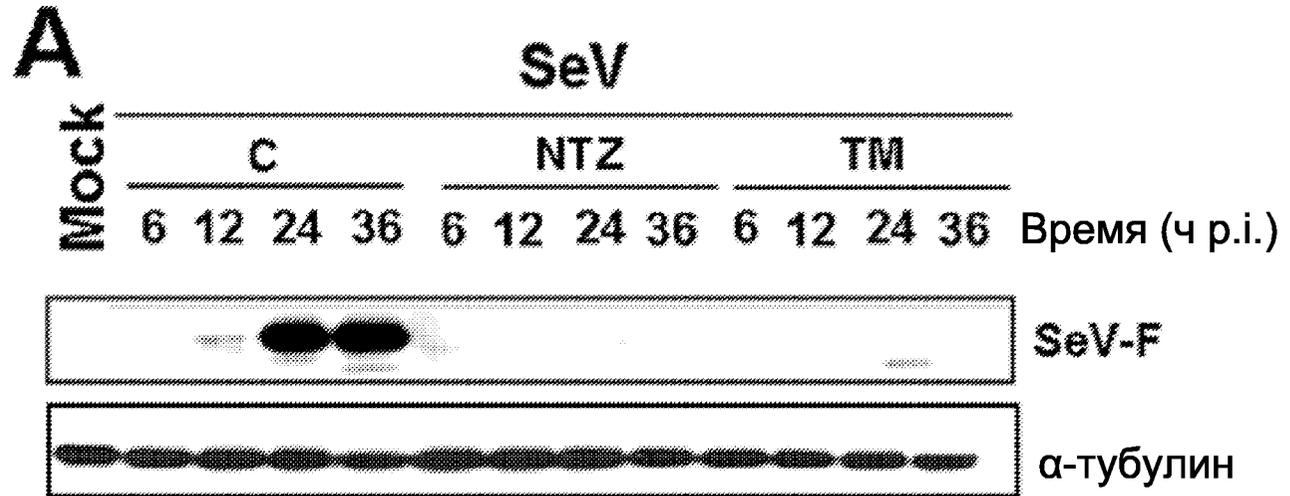
ФИГ. 12



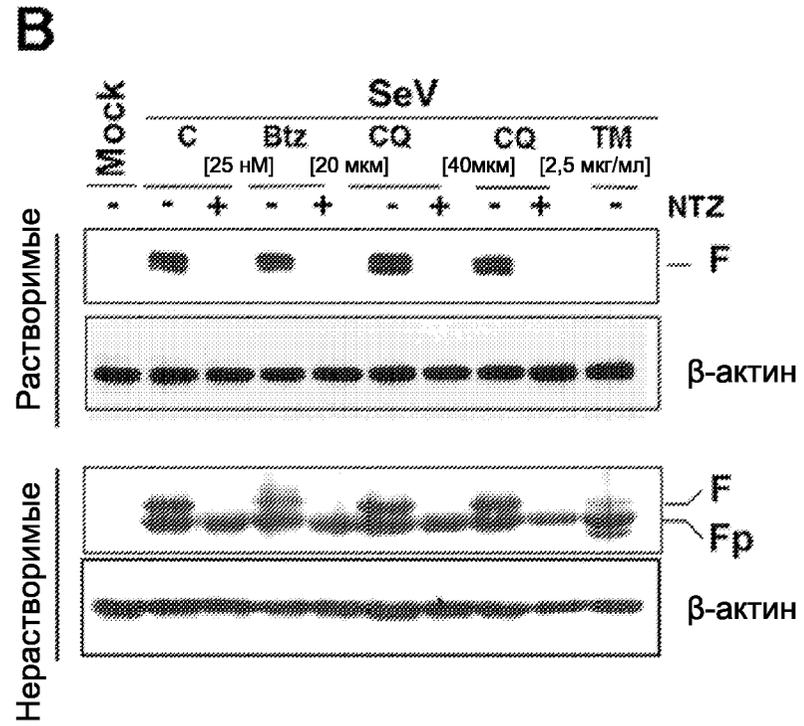
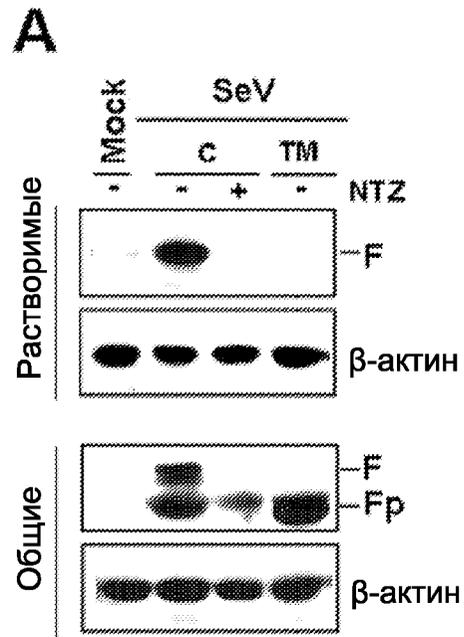
ФИГ. 13А-В



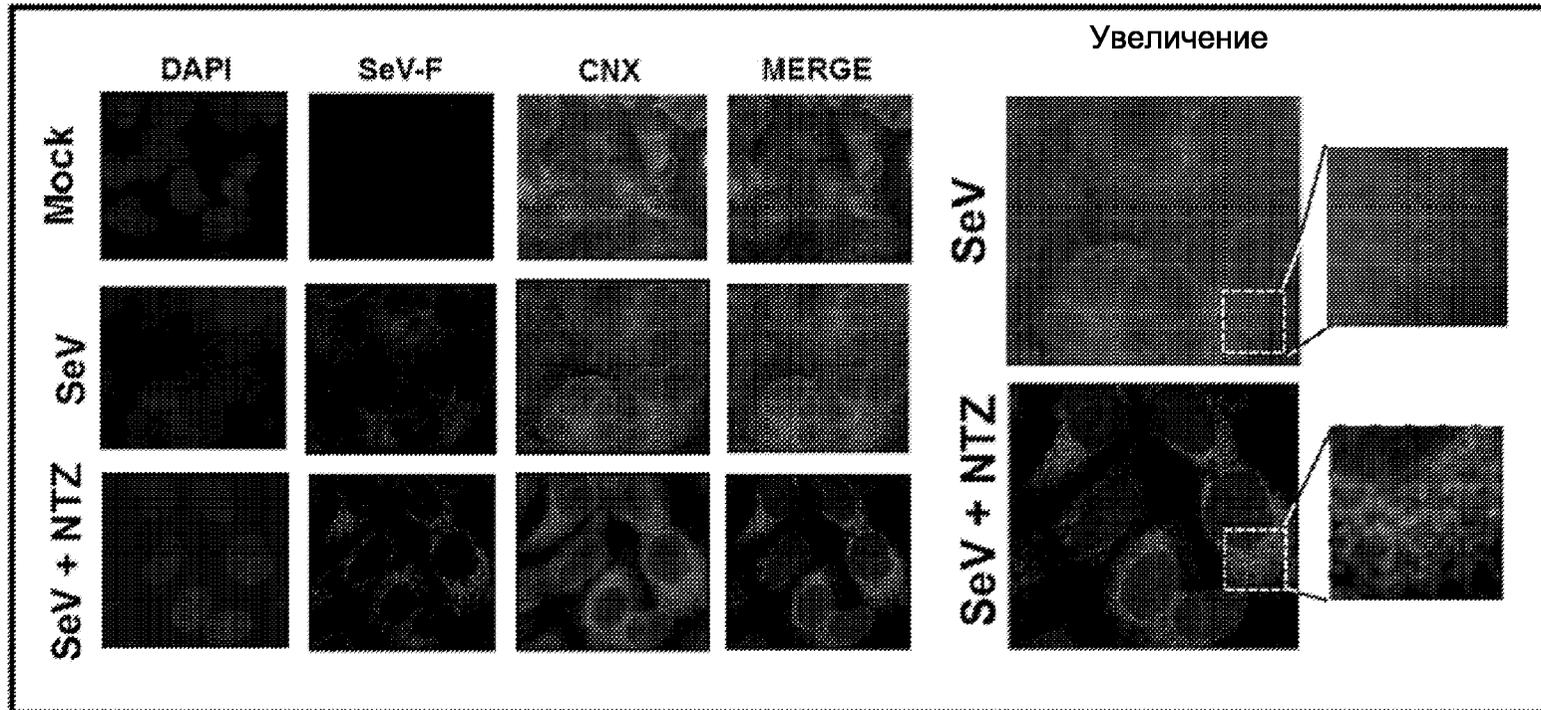
ФИГ. 14А-В



ФИГ. 15А-В



ФИГ. 16

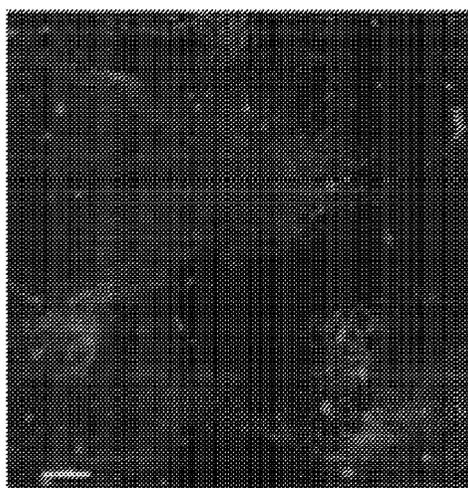


ФИГ. 17

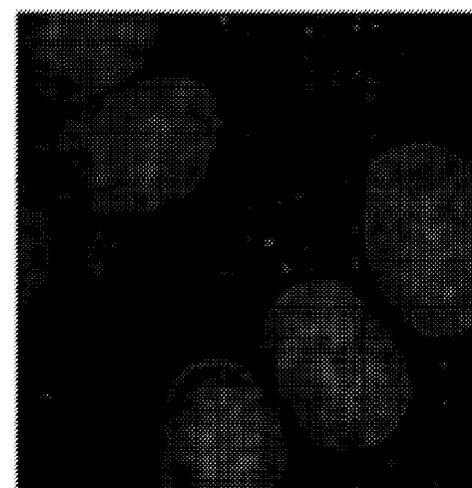
Мечение поверхности SeV-F



Mock

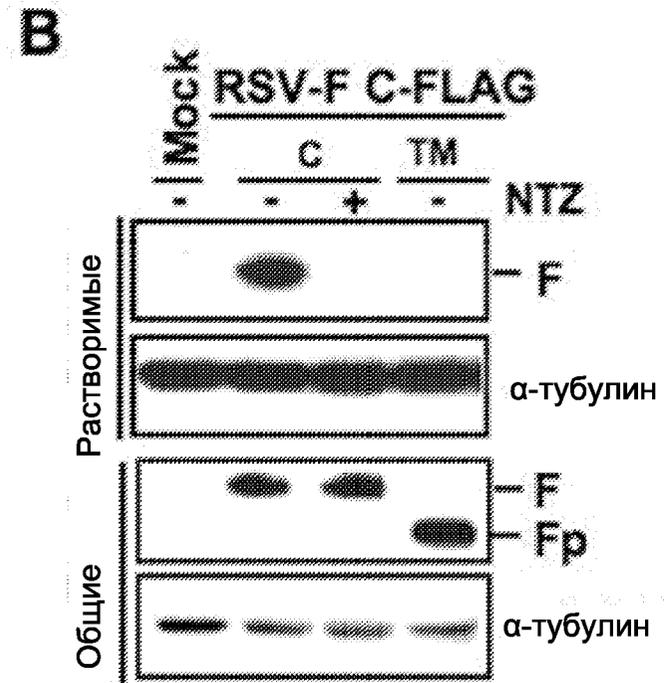
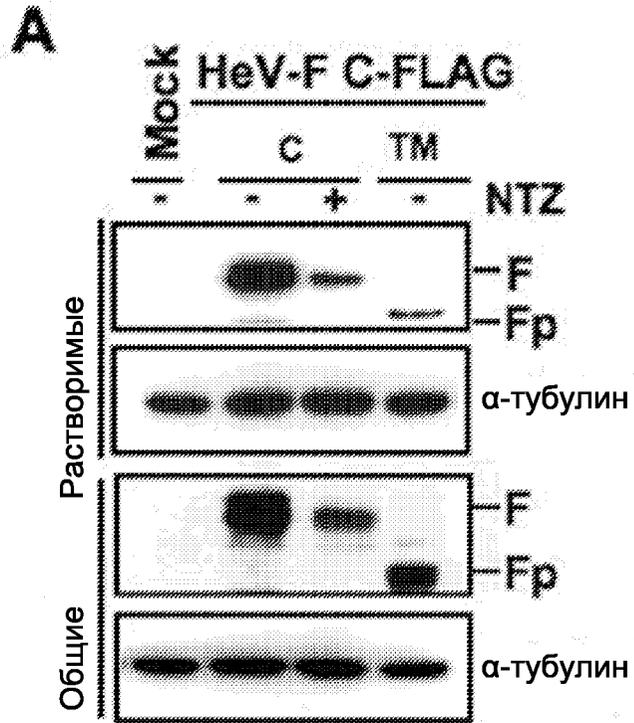


SeV

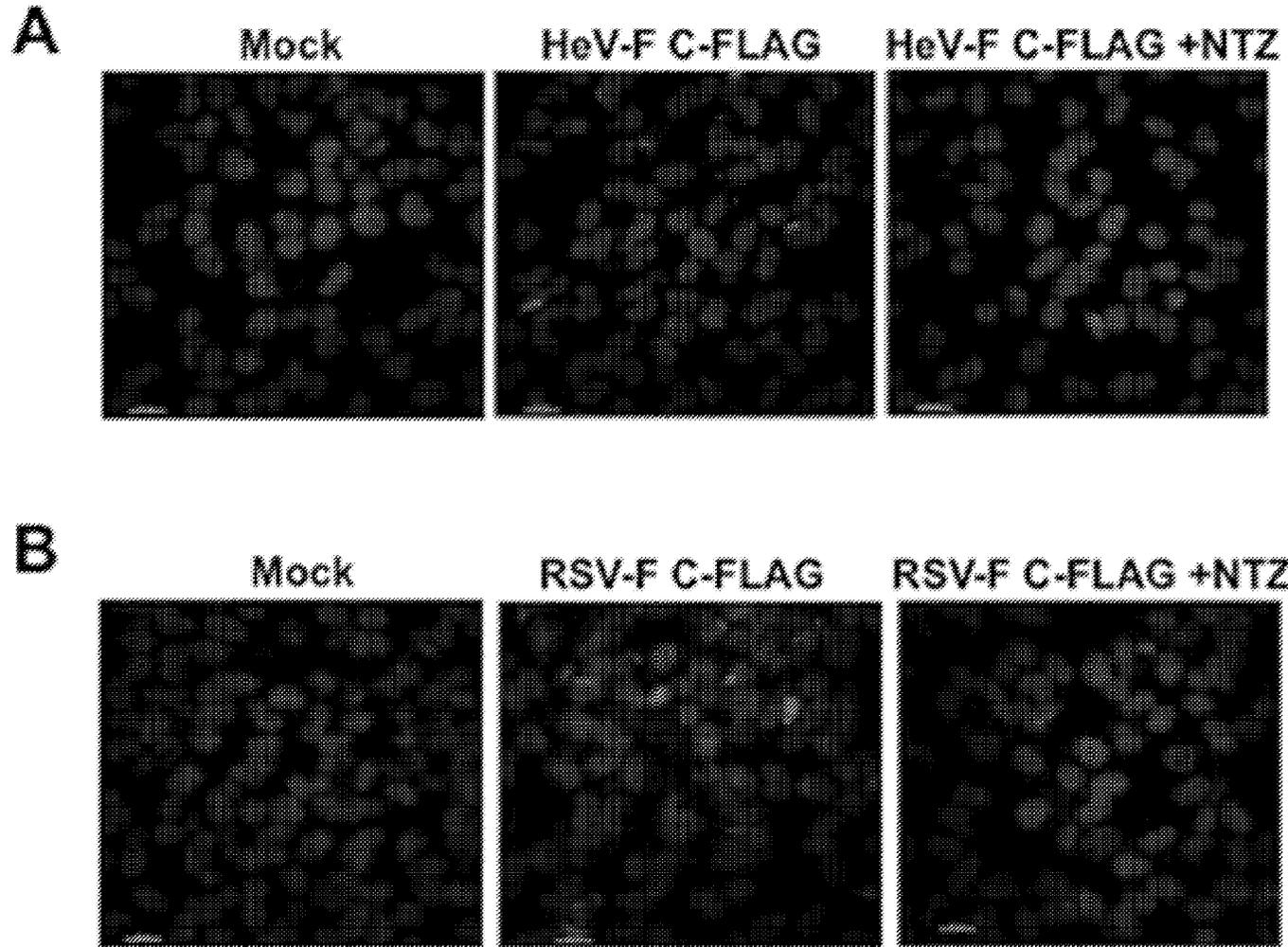


SeV + NTZ

ФИГ. 18А-В



ФИГ. 19А-В



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/024976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K45/06 A61K31/426 A61P31/12
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>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/sim2015-atti.pdf [retrieved on 2017-05-09] See poster abstract P012 on page 66 ----- -/--</p>	1-6,9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 June 2017

Date of mailing of the international search report

05/07/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Allnutt, Sarah

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/024976

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>"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_abstract_book.pdf [retrieved on 2017-05-08] See Poster Abstract P54 on page 81</p>	1-6,9
X	<p>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</p>	1-6,9
X	<p>ROSSIGNOL JEAN-FRANÇOIS ED - 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</p>	1-6,9
X	<p>US 2010/330173 A1 (ROSSIGNOL JEAN-FRANCOIS [US] ET AL) 30 December 2010 (2010-12-30) paragraphs [0187], [0190], [0193], [0194]; tables 3-5</p>	1,4-6,9
A		14-24
Y	<p>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</p>	4,7,8, 10-13
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/024976

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>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</p>	4,7,8, 10-13
Y	<p>----- 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</p>	4,7,8, 10-13
X,P	<p>----- 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/sim2016-abstract-book.pdf [retrieved on 2017-05-09] See poster abstract P094 on page 123</p>	1,6-13
A	<p>----- 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</p>	14-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2017/024976
--

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 2010330173	A1	30-12-2010	AU	2010264479 A1	19-01-2012
			BR	PI1014322 A2	25-08-2015
			CA	2766642 A1	29-12-2010
			CA	2968113 A1	29-12-2010
			CN	102480967 A	30-05-2012
			EA	201270077 A1	28-12-2012
			EP	2445349 A1	02-05-2012
			JP	5932640 B2	08-06-2016
			JP	2012531420 A	10-12-2012
			JP	2016172749 A	29-09-2016
			KR	20120102570 A	18-09-2012
			MX	341877 B	06-09-2016
			US	2010330173 A1	30-12-2010
			US	2015250768 A1	10-09-2015
			US	2016228415 A1	11-08-2016
			WO	2010151577 A1	29-12-2010
			ZA	201200263 B	26-09-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/024976

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-13

A method of treating a disease or condition caused by or associated with a virus belonging to the Paramyxoviridae family, comprising administering to a subject in need thereof an effective amount of a pharmaceutical composition comprising at least one of nitazoxanide or tizoxanide or a pharmaceutically acceptable salt thereof, wherein the effective amount is an amount which blocks in the subject the maturation of the fusion (F) glycoprotein of the virus.

2. claims: 14-24

A method of treating a disease or condition caused by or associated with a virus belonging to the Picornaviridae family, comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising at least one of nitazoxanide or tizoxanide or a pharmaceutically acceptable salt thereof.
